Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Effekt von LH-RH bei pubertären und erwachsenen männlichen Ratten, die postnatal in der kritischen Periode mit Östradiolbenzoat behandelt wurden.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Karl-Heinz Fischer
aus Gräfendorf

1983

Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Effekt von LH-RH bei pubertären und erwachsenen männlichen Ratten, die postnatal in der kritischen Periode mit Östradiolbenzoat behandelt wurden.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Karl-Heinz Fischer
aus Gräfendorf

1983

Dekan: Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Gupta
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Moeller

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0047

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung 1

2. Problemstellung 7

3. Materialien und Reagenzien. 8

4. Methoden und Versuchsbeschreibungen 11

4.1 Applikation von Östradiolbenzoat (EB) ... 11

4.2 Gruppen A und B 12

4.3 Narkose 12

4.4 Gewinnung des Untersuchungsmaterials 12

4.5 Anatomische Verhältnisse 13

4.6 Präparation der Vena femoralis 13

4.7 Applikation des Releasing-Hormons LH-RH und Blutentnahmen 14

4.8 Serumgewinnung 14

4.9 Radioimmunassay für LH und FSH (RIA) 15

4.10 Jodierung des Hormons (Chloramin - T - Methode) (108) 15

4.11 Herstellung einer Sephadexsäule 16

4.12 Test auf Bindung mit dem Antikörper (B - O - Bindung) 17

4.13 Messung der Radioaktivität 17

4.14 Standardverdünnung 17

4.15 Darstellung der Standardkurven 17

4.16 Die Radioimmunassay-Methode (speziell) 18

4.17 Statistische Auswertung 19

5. Ergebnisse 22

5.1 Entwicklung der Ratten am 20. Lebenstag 22

5.2 Serum-Basalwerte LH und FSH 22

5.3 35 Tage alte Ratten (Pubertät) ohne EB 25

5.4 35 Tage alte Ratten (Pubertät) mit EB 26

5.5 90 Tage alte Ratten (Adult) ohne EB 35

5.6 90 Tage alte Ratten (Adult) mit EB 36

6. Diskussion 43
7. Zusammenfassung 49
8. Anhang 50
9. Literaturverzeichnis 51

1. Einleitung

Behandelt man sexuell reife Ratten mit androgenen oder östrogenen Hormonen, so kommt es zu einer vorübergehenden Suppression der Hypothalamus - Hypophysen - Gonaden - Achse, die jedoch nach Absetzen der Therapie ihren früheren Regelkreis wieder aufnimmt (KINCL and ZBUZKOVA[44], MARTINI[47]).

Anders allerdings verhält sich dies bei perinataler Steroidapplikation (BARRACLOUGH[2], BROWN-GRANT[7,8], DÖRNER[14], FELS und BOSCH[21], GORSKI[25], KINCL[43]). Eine "kritische Periode" für die Differenzierung von Zentren des Zentralen Nervensystems (ZNS), das später in einem Feedback-Regelkreis die Freisetzung der Gonadotropen-Hormone über Releasing Hormone steuert, scheint einige Tage um die Geburt zu liegen.

GUPTA[32] führte Untersuchungen in dieser "kritischen Periode" mit Testosteron-Antiserum (TA) und Gonadotropin-Antiserum (GA) durch. Er injizierte männlichen Ratten TA und GA am 15. und 16. Tag des Fötallebens und/oder perinatal am 2. bis 5. Lebenstag. Die Tiere zeigten im erwachsenen Alter eine niedrigere Sprungfrequenz, einen höheren Lordosequotient und waren nicht in der Lage, weibliche Ratten zu befruchten. Er folgerte daraus, daß TA und GA, während der "kritischen Periode" perinatal verabreicht, verantwortlich sind für das Ausbleiben der "Maskulinisation" der Verhaltenszentren im ZNS, wobei TA potenter ist als GA.

Die erste klassische endokrinologische Untersuchung wurde 1849 von BERTHOLD[6] beschrieben. Er fand, daß die Kastration von erwachsenen Hähnen zu einer Atrophie der Genitalorgane und zu einer Abnahme des männlichen Sexualverhaltens führt. PFEIFFER[54] schloß 1936 aus seinen Versuchen, daß die Ratten mit einem undifferenzierten Gonadotropinsekre-

tionsmechanismus geboren werden, der sich unabhängig vom genetischen Geschlecht unter dem Einfluß von Sexualhormonen zu einem weiblichen oder männlichen Typus entwickelt. Als Ort der Differenzierung nahm er die Hypophyse an. Jedoch vermuteten HOHLWEG und JUNKMANN[40] schon 1932, daß ein Sexualzentrum im Gehirn die Freisetzung der gonadotropen Hormone nach einem bestimmten Muster steuert, welches von den Gonaden beeinflußt wird.

Mit dem Nachweis der hypothalamischen Wirkung durch neurohumorale Regulation über die hypophysären Portalgefäße an den Hypophysenvorderlappen (HVL) konnte HARRIS[37] 1955 den Zusammenhang zwischen Hypothalamus und Hypophyse nachweisen. Dies wurde in der Folgezeit durch verschiedene Autoren bestätigt (BARRACLOUGH / GORSKI[3,4], DÖRNER / DÖCKE[15], GORSKI / WAGNER[28], HARRIS[37]).

IGARASHI und McCANN[41], SCHALLY und MITARBEITER[55 - 58] bezeichneten die Hypothalamus-Hormone als Releasing-Hormone, extrahierten sie und wiesen ihre hypophyseotrope Wirkung nach. Somit zeigte es sich als richtig, einen Regelkreis Hypothalamus - Hypophyse - Gonaden anzunehmen, was sich in zahlreichen Versuchen bestätigte (GUPTA[30,31,33], DONOVAN[17]).
Siehe Abb. 1

Dieser Rückkopplungsmechanismus der hypothalamischen - hypophysären - gonadalen - Achse ist allerdings komplex und noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich steht sowohl LH als auch FSH unter der Kontrolle der hypothalamischen Releasinghormone für Gonadotropine Gn-RH. LH-RH bewirkt die Freisetzung von LH und FSH aus der Adenohypophyse (SCHALLY[59]). Die Vorstellungen über ein spezifisches Releasing-Hormon für FSH (GUPTA[34], OJEDA[52], SCHALLY[55 - 57]) sind noch nicht bewiesen (siehe Abb. 1).

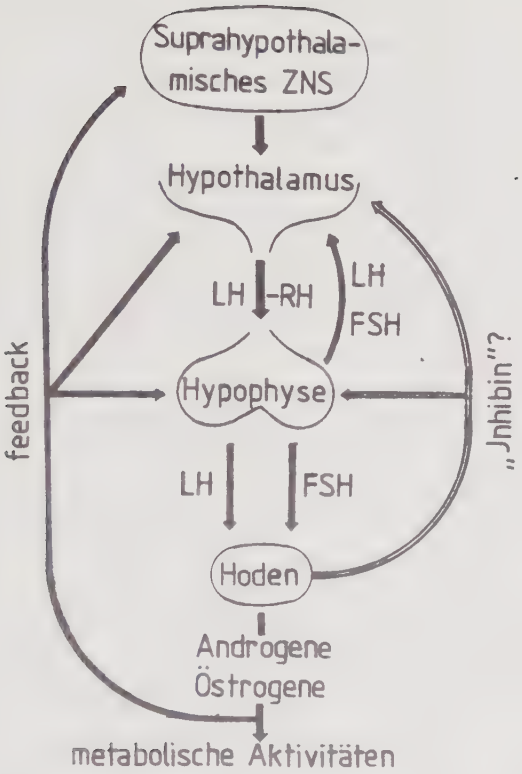

Abb. 1: Schematische Ansicht der hypothalmischen - hypophysären - gonadalen Achse und dem Feedback-Mechanismus. (Modifiziert nach GUPTA[33]).

Viele Forscher versuchten dieses oben beschriebene Zentrum der Sexualdifferenzierung im Hypothalamus genauer zu lokalisieren. BARRACLOUGH / GORSKI [2,3] nahmen eine tonische (Nuclei ventromedialis) und eine zyklische (Area preoptica) Region im Hypothalamus an, welche die Gonadotropinsekretion der Hypophyse kontrollieren. Hierbei wird zum Zeitpunkt der Pubertät die zyklische Freisetzung aktiviert. Bei der weiblichen Ratte scheint die Area preoptica eine Schlüsselrolle einzunehmen. Sie ist jedoch sicherlich nicht die einzige Area des ZNS welche die Ovulation auslöst (DONOVAN[17], EVERETT[19], GORSKI[26]). GOOMER[24] folgerte aus seinem Versuch, daß es durch die neonatale Östradiolgabe zu einer Verhinderung der zyklischen Sekretion von LH bei den Rattenweibchen kommt.

DÖRNER und MITARBEITER[14 - 16] lokalisierten das Sexualzentrum im mediobasalen Hypothalamus. Dieses Zentrum so zeigte sich, ist zur Zeit der Geburt noch "plastisch" und kann unabhängig vom genetischen Geschlecht weiblich oder männlich differenziert werden. Sie fanden, daß Veränderungen des Sexualhormonspiegels während der Hypothalmusdifferenzierung zu permanenten Sexualdeviationen (Hypo-, Bi- oder Homosexualität), gegengeschlechtlichem Sexualverhalten und/oder gonadalen Funktionsstörungen führen können.

Diese "kritische Periode" für die Differenzierung im Hypothalamus liegt perinatal. BROWN-GRANT[8], HARRIS / LEVINE[39], KINCL[43], LADOSKY / KESIKOWSKI[45] erzeugten durch Verabreichung von Östradiol Benzoat (EB) im frühen Postnatalleben (bis zu 5 Tagen p.p.) bei Rattenmännchen Infertilität, Hemmung der Spermiogenese, verminderte Androgenproduktion im Hoden und Atrophie der Sexualorgane. Allerdings kommt es nicht zu einem völligen Fehlen der sexuellen Entwicklung nach 90 Tagen (BROWN-GRANT[8], LADOSKY / KESIKOWSKI[45]). Die Behandlung nach 10 oder 20 Tagen war ineffektiv.

DHAR[12] fand im Hoden und Nebenhoden bei 60 Tage alten Ratten, die am 5. Lebenstag mit EB behandelt wurden, histologische Merkmale, die Entwicklungsstufen infantiler Tiere entsprachen. Auch LADOSKY und KESIKOWSKI[45] beobachteten eine Verzögerung der Spermatogenese am 35. und 60. Lebenstag, jedoch waren die histologischen Merkmale des Hodens und die Fertilität am 90. Tag reversibel.

Neonatale Applikation von Androgenen (BARRACLOUGH[2]) oder Östrogenen (GORSKI[25], DÖRNER[16]) an weibliche Ratten zeigten postpubertal Sterilität, Anovulation und persistierenden Vaginalöstrus. BROWN-GRANT[7] fand in 100 % der Fälle Anovulation bei neonataler Gabe von EB bis zum 8. Tag p.p. Diese Untersuchungen ließen vermuten, daß eine Beeinflussung der Zentren des ZNS bereits pränatal möglich sein müßte. Diese Hypothese konnte experimentell bestätigt werden (FELS[20], FELS / BOSCH[21], FLERKO[23]). Bei pränataler Testosteron- oder Östrogeninjektion werden Veränderungen der Keimdrüsen hervorgerufen, die vergleichbar sind mit denen bei postnataler Applikation.

Diese Umstimmung im Hypothalamus während der "kritischen Periode" wird bei der weiblichen Ratte auch als "androgenisierte Maskulinisierung" bzw. bei der männlichen Ratte als "östrogenisierte Feminisierung" bezeichnet (GORSKI[27]).

Es ist also als gesichert anzusehen, daß die Behandlung von weiblichen Ratten kurz nach der Geburt mit Androgenen (nach McDONALD / DOUGHTY[48] nur aromatisierbare Androgene) oder Östrogenen, bei männlichen Ratten nur Östrogene zu einer Suppression der Gonadenfunktion führen, wenn diese Tiere die Reife erreichen. Die Untersuchungen deuten darauf hin, daß während der neonatalen Entwicklung exogen applizierte gonadale Hormone Zentren im ZNS verändern, die im erwachsenen Alter die Gonadenfunktion steuern. Aber auch andere Modalitäten könnten daran beteiligt

sein. So beobachteten JOSEPH und KINCL[42] bei postnataler Behandlung mit 250 ug EB im Hoden erwachsener Ratten einen enzymatischen Mangel mit Abnahme der Nutzbarmachung von C-21 Vorläufern und 17-Oxyreduktion. KINCL und ZBUZUKOVA[44] fanden eine verminderte Rate der Testosterontransformation im Plasma.

Der genaue Mechanismus der neonatalen Differenzierung des Hypothalamus im Bezug zu den Gonaden ist letztendlich noch unklar.

In dieser Arbeit sollten mögliche Veränderungen der Hormonausschüttung der Gonadotropine nach exogener Gabe von LH-RH an männlichen Ratten untersucht werden, die am 3., 4. und 5. Tag p.p. täglich mit 100 ug EB (gesamt 300 ug) behandelt wurden.

2. Problemstellung

Das Thema der folgenden Arbeit:

1. Gibt es Veränderungen der Serum-Basalkonzentrationen von LH und FSH bei mit Östradiolbenzoat (EB) neonatal behandelten im Vergleich zu mit Sesamöl behandelten (Kontrollgruppe, i.f. als unbehandelt beschrieben) männlichen Ratten nach 35 und 90 Lebenstagen?

2. Wie verhält sich der LH- bzw. FSH-Serumspiegel in Abhängigkeit von der Zeit bei s.c. Applikation von Östradiolbenzoat (EB) p.p. im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sesamöl) nach LH-RH Injektion

   1. bei 35 Tage alten männlichen Ratten - Pubertät?
   2. bei 90 Tage alten männlichen Ratten - Adult?

3. Gibt es Verschiebungen in den Peaks?

4. Kommt es zu Körpergewichtsveränderungen am 35. und 90. Tag zwischen beiden Gruppen?

3. Materialien und Reagenzien

Chirurgische und anatomische Pinzette
Chirurgische Schere
Klemme
Nadelhalter
Faden: Ethilon FS-2
Atraumatische Rundnadel
Fa. PROMONTA, Hamburg
Vetren^{R}
Fa. ABBOTT IRELAND LIMITED FLIGO, Irland
Nembutal^{R}
Fa. FLUKA AG, Buchs (Schweiz)
Östradiol - Benzoat
Fa. HÖCHST, Frankfurt
LH-RH (synthetisches)
Fa. ABBOTT IRELAND LIMITED FLIGO, Irland
Butterfly^{R} - 21, INT (0,8 mm)
Fa. HARTMANN, Heidenheim / Brenz
Insulinspritze
Fa. SERVA - Feinbiochemika, Heidelberg

Saccharose reinst	Nr. 35580
Äthylmercurithiosalicylsäure	Nr. 11375

Fa. MERCK, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H_2O	Nr. 6580
Natriumdihydrogenphosphat x 2 H_2O	Nr. 6345
Natriumchlorid	Nr. 6404
Kaliumjodid neutral	Nr. 5043
Äthylendinitrilotetraessigsäure	Nr. 8436
Chloramin T (Trihydrat)	Nr. 2426
Natriumpyrosulfit	Nr. 6528
Chloroform	Nr. 2445
Bromphenolblau	Nr. 8122
Äther	Nr. 921

Fa. AMERSHAM BUCHER, Braunschweig
Jod - 125 (Na-Salz) IMS. 30

BERINGWERKE, Marburg / Lahn
Rinderserumalbumin
NATIONAL INSTITUTE OF ARTHRITIS AND METABOLIC DESEASES AND DISORDERS (NIAMDD), Bethesda MD., USA
Purified Rat Luteinizing Hormone
(NIAMDD-Rat LH-I-3)
Antiserum to Rat Luteinizing Hormone
(NIAMDD-Anti-Rat LH Serum-1)
ReferencePreparation
(NIAMDD-Rat LH-RP-1)
Puriefied Rat Follicle Stimulation Hormone
(NIAMDD-Rat FSH-I-1)
Antiserum to Rat Follicle Stimulation Hormone
(NIAMDD-Anti-Rat FSH Serum-6)
Reference Preparation
(NIAMDD-Rat FSH-RP-1

Elutionspuffer für die Jodierung: pH 7,6

13,2 ml 0,1 M $NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$
+86,8 ml 0,1 M $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$
+ 8,7 g NaCl = 0,15 M
+ 100 mg Merthiolat = 0,01 %
ad 1 l H_2O dest. = 0,01 M Phosphatpuffer

Diluent: pH 7,6

Elutionspuffer für die Jodierung
+ 1% Rinderserumalbumin

Stammpuffer: pH 7,6

3,45 g $NaH_2PO \times 2\ H_2O$
+0,8737 g $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$
pH Angleich mit 1N NaOH
ad 500 ml H_2O dest.

Assaypuffer: pH 7,6

Elutionspuffer für die Jodierung

+18,6 g EDTA
+ 30 ml Rabbitserum
ad 1 l H_2O dest.

Transferlösung:

1 % KJ
+ 16 % Sucrose in P 1
+ Bromphenolblau (Spur)

2 % BSA Lösung:

2 g Rinderserumalbumin in Elutionspuffer für die Jodierung

4. Methode und Versuchsbeschreibung

Für das Experiment wurden trächtige Ratten mit einer Tragzeit zwischen 12 - 16 Tagen des Wistar-Stammes aus der Versuchsanstalt von Dr. Ivanos aus Kißlegg im Allgäu bestellt. Bis zum Ende der Tragzeit von 22 - 23 Tagen konnten die Tiere sich an ihre neue Umgebung im Tierstall adaptieren. In einzelnen Käfigen, bei einer Raumtemperatur von durchschnittlich 25 ^{0}C, erhielten sie künstliches Licht von 6^{00} Uhr bis 19^{00} Uhr, Wasser und Nahrung ad libitum.

Unter täglicher Beobachtung konnte das Geburtsdatum der Jungtiere festgehalten werden. Der Tag 1 entspricht dem Geburtstag.

4.1 Applikation von Östradiolbenzoat (EB)

Von den Jungtieren wurden zwei Gruppen gebildet. Die Gruppe A bekam am 3., 4. und 5. Lebenstag p.p. täglich 100 ug EB (gesamt 300 ug) subcutan injiziert. Die Gruppe B (als Kontrolltiere) erhielt die gleiche Menge Sesamöl. Für die Applikation des EB bzw. Sesamöl wurde eine Hautfalte zwischen Hals und Rücken abgehoben, mit einem Butterfly an einer Insulinspritze in die Rückenfalte eingestochen und ganz langsam injiziert. Die Lösung von EB erfolgte in Sesamöl (100 ug EB in 0,1 ml Sesamöl).

Die Jungtiere blieben nun bei dem jeweiligen Muttertier bis zum 20. Tag p.p. Gleichzeitig erfolgte die geschlechtliche Aufteilung, wobei in diesem Versuch nur die männlichen Ratten verwendet wurden. In Gemeinschaftskäfigen von je 5 Tieren wurden sie nun unter den oben beschriebenen Bedingungen untergebracht bis zum Alter von 35 Tagen (pubertär) bzw. 90 Tagen (adult).

4.2 Gruppe A und B

Gruppe A_1: 35 Tage alt, mit EB behandelt
Gruppe A_2: 90 Tage alt, mit EB behandelt

Gruppe B_1: 35 Tage alt, mit Sesamöl behandelt (Kontrolltiere)
Gruppe B_2: 90 Tage alt, mit Sesamöl behandelt (Kontrolltiere)

Jede Gruppe bestand aus 8 - 11 Ratten

4.3 Narkose

Als Narkose wurde Nembutal^R (Pentobarbital) in einer Konzentration von 30 mg/kg Körpergewicht für die pubertären und 35 mg/kg Körpergewicht für die adulten Tiere verwendet. Die Injektion erfolgte intraperitoneal zwischen Nabel und Femurkopf bei dorso-lateraler Streckung einer hinteren Extremität. Das Halten und Spritzen wurde zügig durchgeführt, um den Streßfaktor möglichst niedrig und konstant für alle Tiere zu halten.

Bis zur Wirkung der Vollnarkose, d.h. bis die Tiere auf Schmerzreize keine Fluchtreaktionen mehr zeigten (Narkosestadium III = Toleranzstadium), vergingen ca. 30 Minuten. Solange wurden die Tiere in einen anderen Käfig gegeben.

4.4 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Sämtliche Methoden zur Materialgewinnung laufen darauf hinaus, daß die gewünschten Meßpunkte über einen Zeitraum bis zu 120 bzw. 180 Minuten an einem Tier gemessen wurden. Man erhält so den tatsächlichen Konzentrationsverlauf der Serum-Gonadotropine nach LH-RH Stimulation für jede Ratte zum definierten Zeitpunkt. Diesem Vorteil steht ein Nachteil der Methode gegenüber. Die mehrmalige Blutentnahme führte zu einem relativ großen Blutverlust, so daß trotz Volumensubstitution mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung (Saline) ein Teil der pubertären Tiere vor Versuchsende im Kreislaufversagen starb.

Die Einzelwerte zu den definierten Zeitpunkten wurden in einem Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (s) zusammengefaßt.

Die Applikation von LH-RH oder der 0,9 %-igen NaCl-Lösung (Saline) und die anschließende NaCl-Heparin Verdünnung, sowie die Blutentnahmen erfolgten durch einen Butterfly, der an der Vena femoralis unter Sicht gelegt wurde.

Sämtliche Pharmaka wurden in Relation zum Körpergewicht appliziert mit Ausnahme des EB an den neugeborenen Tieren.

4.5 Anatomische Verhältnisse

Durch Heranziehung zoologischer Literatur (HAGEMANN[36]) konnte ein günstiger venöser Zugang gewählt werden. Nach den topographischen Verhältnissen dürfte es sich hierbei um die Vena femoralis handeln.

4.6 Präparation der Vena femoralis

Auf einer Korkplatte wurden die Ratten, nachdem sie narkotisiert waren, auf dem Rücken liegend an den vier Extremitäten, fixiert. Mit einer chirurgischen Pinzette wurde das Fell auf der kontralateralen Seite der i.p. Narkoseinjektion in der Leistenbeuge abgehoben, ein Fellschnitt gelegt und unter stumpfer Freipräparation die Vena femoralis vom oberen Rand des Knies bis an den lateralen Rand des Muskulus psoas major ohne Eröffnung des Peritoneums dargestellt.

Proximal vom Eintritt der Vena saphena in die Vena femoralis wurde mit einer atraumatischen Rundnadel um die Arterie, Vene und den Nervus femoralis das Vitalene eingezogen, das später zur Fixation der Butterflynadel diente.

In eine 1ml Insulinspritze mit einem Butterfly (Short Nr. 21, dickere Nadel, dadurch geringere Hämolyse) wurden 20 IE Vetren^{R} (Heparin) pro 100 g Körpergewicht aufgezogen. Un-

ter Stauung der Vena femoralis durch Fingerdruck auf das Abdomen wurde die Vene punktiert, die Butterflynadel mit dem vorher gelegten Faden fixiert und das aufgezogene Heparin appliziert. Dadurch wird eine Blutgerinnung innerhalb des Butterllysystems mit Sicherheit verhindert. Danach wurde der Butterflyschlauch mit 0,2 ml NaCl 0,9 % und Heparin (gemischt 20 : 1) nachgespült.

4.7 Applikation des Releasing - Hormons LH-RH und Blutentnahmen

Nachdem das Heparin kurze Zeit zirkuliert hatte, erfolgte die Abnahme von 0,6 ml Blut als Basalwert (Nullwert) für die spätere Bestimmung von LH bzw. FSH. Dann sofortige Applikation von synthetischem LH-RH (0,4 ug / 100 g Körpergewicht, gelöst in 0,16 ml NaCl 0,9% (Saline) bzw. Saline (0,16 ml/ 100 g Körpergewicht) bei den Kontrolltieren. Danach Spülung des Butterflyschlauches wie oben beschrieben. Es wurden dann weiter nach 10, 30, 60 und 120 Minuten (wenn möglich bis 180 Minuten) jeweils ca. 0,6 ml Blut entnommen und nach jeder Blutentnahme ca. 0,6 ml NaCl 0,9% zur Auffüllung des Kreislaufvolumens in einem Zeitraum von 3 - 6 Minuten nachgespritzt.

Nach der 5. bzw. 6. Blutentnahme wurden die Tiere in einem mit Äther getränken Behälter getötet.

4.8 Serumgewinnung

Das Blut wurde nach der Entnahme in Eppendorfhütchen gegeben und blieb bei Zimmertemperatur ca. 1 Std. stehen. Vor der Zentrifugation ist mit einem sauberen Glasstab umgerührt worden, so daß eine Ablösung der geronnenen Teile von der Wand des Zentrifugenröhrchens gewährleistet war. Auf einer Tischzentrifuge (Firma Christ, TyP JU 2) wurde bei 3000 Umdrehungen pro Minute 12 Minuten lang zentrifugiert, das Serum anschließend mit einer Eppendorfpipette abpipe-

tiert (ca. 0,3 ml) und bei minus 20 °C bis zum gemeinsamen Radioimmunassay aufbewahrt.

4.9 Radioimmunassay für LH und FSH (RIA)

Der RIA ist eine hochempfindliche quantitative in -vitro- Methode. Mit diesem Verfahren können sehr viele verschiede- Verbindungen bestimmt werden. Z.B. Steroide, Hormone, Proteine und andere biologisch aktive Substanzen. Der RIA beruht darauf, daß in einem immunologischen System das Antigen (hier: Glykoproteine FSH und LH) von einem hochspezifischen globulären Proteinmolekül, dem Antikörper, erkannt und in einem Komplex aus beiden Molekülen gebunden wird. Dieser Antigen - Antikörper - Komplex macht durch seine Größe eine physikalisch - chemische Trennung von anderen Proteinkomponenten des Systems möglich.

Die RIA-s für Plasma-LH und Plasma-FSH wurden so durchgeführt, wie es in den RIA-Bestimmungen beschrieben ist, entsprechend dem Rat Pituitary Distribution Programm, NIAMDD. Der zweite Antikörper, der benutzt wurde war Anti - Ratten - γ - Globulin von der Firma Wellcome Laboratories (England). Reines LH und FSH von Ratten wurde jodiert mit der Chloramine - T - Methode von Greenwood, Hunter & Glover (1963). Alle Seren wurden mit einem einzigen Ansatz gemessen. In dem Ansatz betrug der Schwankungsgrad der zu bestimmenden Werte 7%. Die LH - Werte sind angegeben in Einheiten von NIAMDD - Rat - LH - RP - 1 und von FSH in Einheiten von NIAMDD - Rat - FSH - RP - 1 als ng/ml.

4.10 Jodierung des Hormons (Chloramin - T - Methode)(108)

Reihenfolge des Pipettierens bei der Jodierung:

1. 2 ug (normalerweise in 20 ul Puffer) des Hormons
2. 20 ul des 0,5 M Phosphatpuffers
3. 0,5 mCi ^{125}J (entsprechen normalerweise 5 ul Lösung)

4. 10 ul Chloramin T (125 mg in 50 ml 0,01 M Phosphatpuffer gelöst)
5. Reaktionszeit 1 Minute; dabei auf einem Schüttelgerät Typ Rotamixer, Fa. Hock und Tucker HT) schütteln
6. 30 ul Natriumpyrosulfit (125 mg in 50 ml 0,01 M Phosphatpuffer gelöst)
7. 100 ul Transferlösung
8. Übertragung des Reaktionsgemisches auf die Sephadexsäule (G-75-Füllung)
9. Reaktionsgefäß mit 2 Mal 20 ul 2 % BSA - Lösung nachspülen und ebenfalls auf die Sephadexsäule übertragen
10. Sephadexsäulenfüllung mit 0,01 M Phosphatpuffer eluieren
11. Fraktionen von 1 ml sammeln (Vorlage: 0,5 ml 2 % BSA-Lösung)

Aus der Verteilung der Radioaktivität in diesen Fraktionen ergibt sich eine Elutionskurve mit zwei Peaks. Der Hauptpeak bedeutet das radioaktiv markierte Hormon, während der zweite Peak - auch Salzpeak genannt - Bruchstücke des Hormons, Verunreinigungen sowie freies radioaktives Jod darstellt.

4.11 Herstellung einer Sephadexsäule

Sie ergibt sich aus folgenden Schritten:

1. 5-6 g Sephadex G-75 mit destilliertem Wasser oder 0,01 M Phosphatpuffer ca. 60 Minuten kochen oder über Nacht quellen lassen
2. erkalten lassen
3. Säule in gewünschter Höhe füllen
4. mit 0,01 M Phosphatpuffer 2-3 Mal eluieren
5. mit 2 % Rinderserumalbumin in Phosphatpufferlösung äquilibrieren

4.12 Test auf Bindung mit dem Antikörper (B - O - Bindung)

Das radioaktive Hormon wird durch Markierungsprozesse u.a. Einflüsse mehr, denaturiert bzw. immunologisch verändert. Es ist daher sinnvoll, zu prüfen, wieweit das markierte Hormon noch funktionsfähig ist. B-O-Bindung ist die Bindung an den Antikörper in Abwesenheit des "kalten" Hormons. Diese Bindung ist konzentrationsabhängig (wie jedes chemische Gleichgewicht).

4.13 Messung der Radioaktivität

Für die Messung der Radioaktivität wurde ein Gamma-Zähler (Typ Packard Auto Gamma Scintillation Spectrometer Nr. 5160 oder Tracerlab Gamma/guard 150) verwendet. Hierbei wurden die von der radioaktiven Substanz ausgestrahlten Impulse über eine Zeit von 200 sec hinweg registriert und als "Counts" gezählt. Das Gerät substrahiert die Summe der ständig einfallenden Strahlen, die als "Background" bezeichnet werden, vom Meßergebnis der Proben.

4.14 Standardverdünnung

Für die Erstellung der Standardkurven für LH und FSH wird das Standard - LH bzw. Standard - FSH in verschiedenen Konzentrationen benötigt. Dazu wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Um die "Reference Preparation" auszugleichen, wird mit Diluent auf eine Stammkonzentration von 100 ug/ml verdünnt. Weitere Verdünnungen ergeben eine Abstufung der Konzentration von 500 ng/100 ul bis 2,5 ng/100 ul.

4.15 Darstellung der Standardkurven

Die Standardkurve kann auf verschiedene Weise dargestellt werden. Hier wurden Counts gegen Hormonmenge auf linearem Millimeterpapier aufgetragen. Die Counts bedeuten den im Antigen - Antikörper - Komplex gebundenen Teil der Gesamt-

radioaktivität. Für diesen Versuch wurde eine Standardkurve für LH und eine für FSH hergestellt.

Siehe Abb. (2) und Abb. (3)

4.16 Die Radioimmunassay - Methode (speziell)

Im Wesentlichen wurden die vom National Institue of Health / Bethesda Md., USA gegebenen Richtlinien übernommen.

Die folgenden Schritte wurden der Reihenfolge nach durchgeführt:

1. Als Assayröhrchen wurden Reagenzröhrchen aus Plastik zum einmaligen Gebrauch verwendet.
2. Diluent (in genügender Menge für ein Gesamtreaktionsvolumen von 800 ul) wurde zugegeben.
3. Weiter wurde zugegeben:
   a) das zu untersuchende Serum (LH bzw. FSH) in einer Menge von 100 bzw. 200 ul
   oder
   b) die Standardverdünnung der Reference Präparation von 500 ng bis 2,5 ng in solchen Zwischenstufen, daß eine Standardkurve gezeichnet werden konnte.
4. 200 ul des Antiserums gegen das jeweilig zu messende Hormon in einer Arbeitsverdünnung von 1 : 10000 bis bis 1 : 15000 in mit 3 % normalem rabbit Serum versetzten Phosphatpuffer.
5. Dieses Gemisch wurde auf einem Rotamix - Schüttler kurz geschüttelt und 24 Stunden bei $4^{o}C$ inkubiert.
6. 100 ul jodiertes Hormon in einer Verdünnung von 40000 counts pro 200 Sekunden dazugegeben.
7. Nach kurzem Schütteln des Reaktionsgemisches 24 Stunden bei $4^{o}C$ inkubiert.
8. Nach dieser Zeit wurden 200 ul genügend (meist 1 : 12) verdünntes anti - rabbit - gamma - Globulin dazu gege-

ben um die maximale Präzipitation des an den Antikörper gebundenen Hormons zu erreichen. Verdünnung mit 0,01 M Phosphatpuffer.

9. Das Gemisch wurde kurz geschüttelt und 3 Tage lang bei 4 °C inkubiert.
10. Zentrifugation bei 2000 x g für 2 Stunden. Der Überstand wird dekantiert. Das Präzipitat in einem Packard bzw. Tracerlab Gammazähler gezählt.
11. Die Röhrchen mit den unbekannten Mengen des Hormons LH bzw. FSH werden mit den Counts der Standardverdünnung der Reference Präparation verglichen. Dazu wird graphisch eine Kurve dieser Standardwerte konstruiert und die Werte der unbekannten Proben direkt aus dieser Kurve abgelesen oder mittels Lochstreifen im Computer ausgewertet. Die Ergebnisse werden als ng NIAMDD-Rat LH-RP-1 bzw. NIAMDD-Rat FSH-RP-1 per ml Serum ausgedrückt.

4.17 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student t-Test (für zweiseitige Fragestellung) nach CLAUSSund EBNER[8a]. Statistisch signifikante Unterschiede liegen unter dem 1 % Niveau - Irrtumswahrscheinlichkeit ($p < 0,01$).

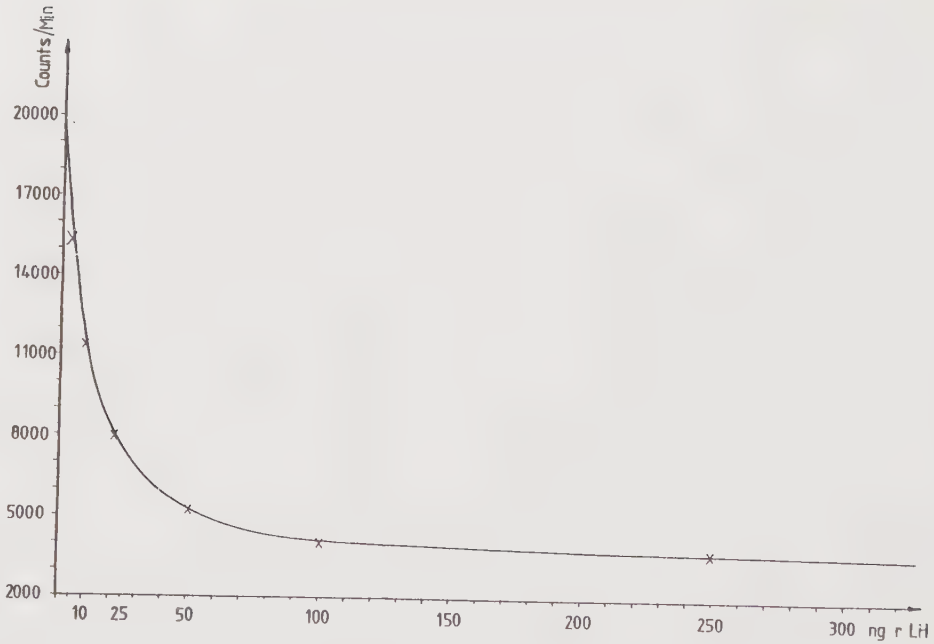

Abb. 2: Standardkurve für RIA LH

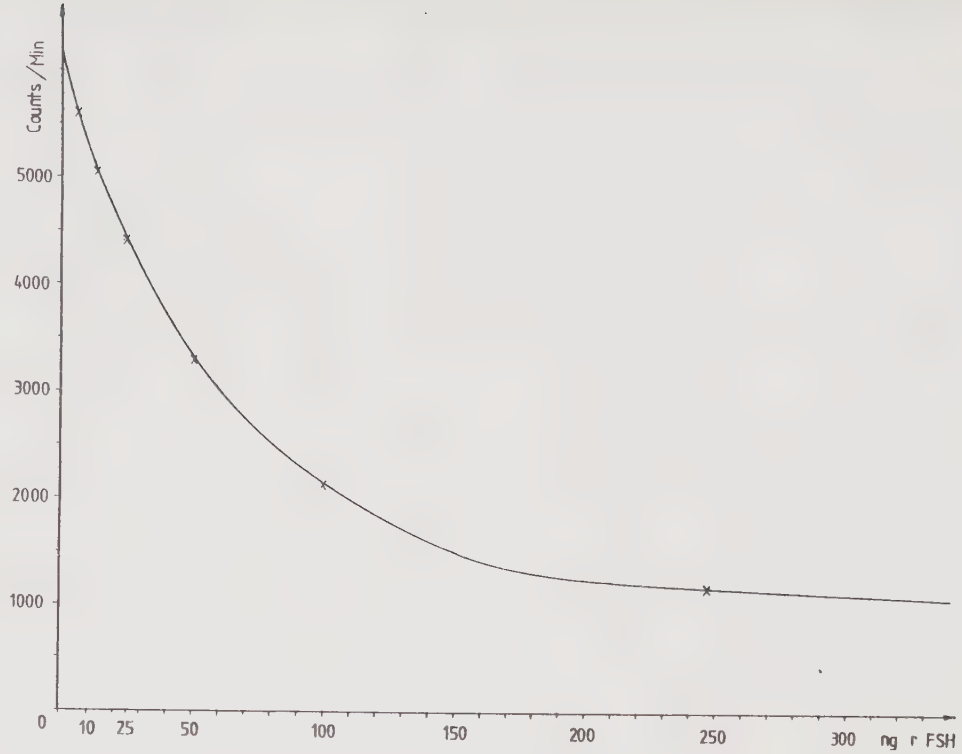

Abb. 3: Standardkurve für RIA FSH

5. Ergebnisse

Aus den unten aufgeführten Schaubildern und Tabellen ist leicht abzulesen, daß die neonatale Behandlung mit EB (Gruppen A_1 und A_2) im Vergleich zu den Kontrolltieren -behandelt mit Sesamöl- (Gruppen B_1 und B_2), nach 35 bzw. 90 Tagen eine Veränderung der Gonadotropinausschüttung nach LH-RH bewirkt. Bei der Injektion von 0,9 %-iger NaCl-Lösung (Saline) im Vergleich zu LH-RH kommt es zu keinem LH bzw. FSH Anstieg im Serum.

5.1 Entwicklung der Ratten am 20. Lebenstag

Bei der Trennung der präpubertären Ratten am 20. Lebenstag von den jeweiligen Muttertieren, erfolgte gleichzeitig die geschlechtliche Aufteilung. Die weiblichen Tiere schieden in diesem Versuch aus. Bei den mit EB neonatal behandelten Ratten konnte optisch festgehalten werden, daß der Hodendeszensus noch nicht statt gefunden hatte. Ferner fiel die geringere Größe der Tiere auf. Die Gewichtsdifferenzen sind auch später, d.h. am 35. und 90. Lebenstag dokumentierbar (siehe unten).

5.2 Serum-Basalwerte LH und FSH

Von je 8 - 11 Tieren der GruppenA_1 und A_2 (mit EB) und B_1 und B_2 (ohne EB) ergeben sich für die Gonadotropine LH und FSH im Serum die aus Tab. I ersichtlichen Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichungen s. Hierbei ist die Basalkonzentration von FSH bei den mit EB behandelten Ratten am 35. Lebenstag signifikant ($p < 0,01$) erniedrigt.

Siehe Abb. 4

	35 Tage						90 Tage					
	FSH (ng/ml)			LH (ng/ml)			FSH (ng/ml)			LH (ng/ml)		
	$\bar{x}$	S	n	$\bar{x}$	S	n	$\bar{x}$	S	n	$\bar{x}$	S	n
mit EB	306^{x}	75	8	23	17	9	325	61	8	21	14	8
ohne EB	499	80	9	32	11	10	335	43	9	31	16	11

Tab. I: Serum-Basalkonzentrationen von FSH und LH am 35. bzw. 90. Lebenstag bei mit/ohne EB behandelten Ratten in der "kritischen Periode" p.p. $\bar{x}$ = Mittelwert, S = Standardabweichung, n = Anzahl der Tiere. ^{x}Wert ist signifikant ($p < 0,01$) erniedrigt.

Körpergewichte (g)						
	35 Tage alt Pubertät			90 Tage alt Adult		
	$\bar{x}$	S	n	$\bar{x}$	S	n
ohne EB	102	9	10	269	19	10
mit EB	89$^{*)}$	9	10	212$^{**)}$	17	10

Tab. II: Körpergewichte (Mittelwerte $\bar{x}$ mit Standardabweichung S, n = Anzahl der Tiere) der pubertären und adulten Ratten, die mit/ohne EB neonatal behandelt wurden. $^{*)}$Wert ist signifikant ($p < 0,01$) erniedrigt. $^{**)}$Wert ist signifikant ($p < 0,001$) erniedrigt.

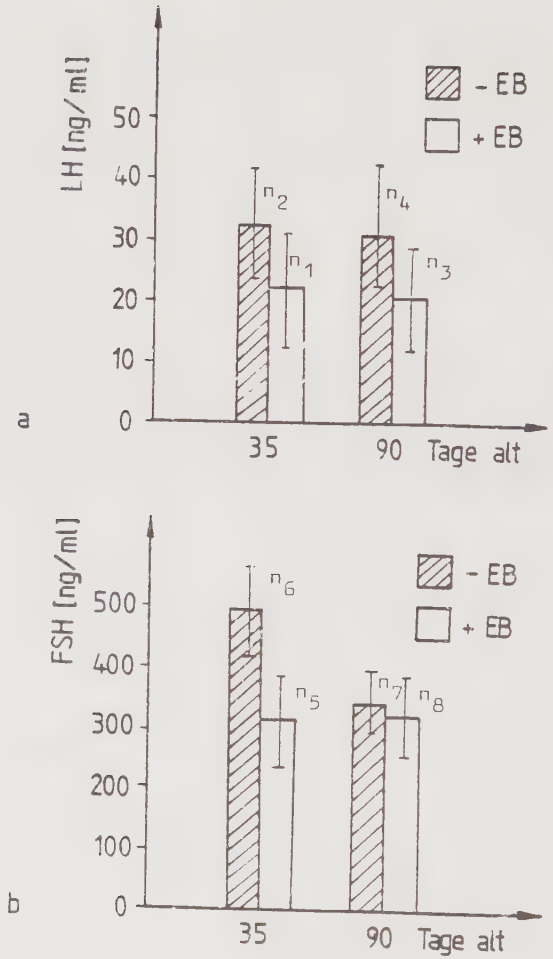

Abb. 4: LH und FSH Serum-Basalwerte nach 35 und 90 Tagen bei neonataler Gabe von EB (= □ + EB) und Sesamöl (= ▨ -EB). Die vertikalen Linien geben die Standardabweichung (±S) an. n = Anzahl der Tiere, n_1=9, n_2=10, n_3=8, n_4=11, n_5=8, n_6=9, n_7=8, n_8=9.

5.3 35 Tage alte Ratten (Pubertät) ohne E8

5.3.1 LH - Serum - Spiegel

Aus der graphischen Darstellung ist für jede Ratte ein kontinuierlicher Anstieg des LH-Serumspiegels nach LH-RH Injektion ausgehend vom Basalwert t_0 (rd. 32,5 ng/ml) bis zum Peak t_{60} (rd. 365 ng/ml) zu erkennen. Danach nimmt die LH-Serumkonzentration wieder ab, wobei dieser Abfall bei den pubertären Tieren schwer zu beurteilen ist, da bis auf zwei Tiere alle kurz nach der 4. Blutentnahme t_{60} starben. Das Diagramm mit den Mittelwerten zeigt äquivalenten Kurvenverlauf.

Siehe Abb. 6 und Abb. 8

5.3.2 FSH - Serum - Spiegel

Ausgehend von einem Basalwert des FSH-Serumsiegels (rd.499 ng/ml) erfolgt bei allen Einzeltieren ein steiler Anstieg des FSH-Serumspiegels nach LH-RH Injektion bis zu t_{60} (rd. 1050 ng/ml). Nach t_{60} bis t_{120} wird die Kurve flach und erreicht nach t_{120} (rd. 1100 ng/ml) möglicherweise den Peak. Da von 8 Tieren bereits 6 Tiere nach t_{60} starben, läßt sich eine genaue Angabe über den Peak nur vermuten. Die Kurve der Mittelwerte zeigt ein vergleichbares Bild.

Siehe Abb. 9 und Abb. 11

5.3.3 Flächenverhältnis FSH / LH

Um eine Verschiebung der Ausschüttung der Gonadotropine FSH und LH zu objektivieren, können die Flächen unter den Kurven ins Verhältnis gesetzt werden. An Hand des jeweiligen Quotienten für die einzelnen Gruppen läßt sich somit eine eventuelle Verschiebung in der Ausschüttung von FSH zu LH erkennen. Hier ergibt sich für das Verhältnis FSH / LH ein Faktor von 3,15.

5.3.4 Körpergewicht

Für die Tiere in der Pubertät -ohne EB- ergibt sich ein durchschnittliches Körpergewicht von 102 g.

Siehe Abb. 5 und Tab. II

5.4 35 Tage alte Ratten (Pubertät) mit EB

5.4.1 LH - Serum - Spiegel

Vom Basalwert (rd. 23 ng/ml) ausgehend erfolgte bei allen Tieren nach der LH-RH Injektion zunächst ein steiler Anstieg des LH-Serumspiegels bis t_{10}, etwas flacher bis t_{30} wo der Peak erreicht wurde (rd. 280 ng/ml). Danach fällt die Kurve bei allen Tieren langsam ab. 5 von 9 Tieren starben nach der 4. Blutentnahme.

Siehe Abb. 7 und Abb. 8

5.4.2 FSH - Serum - Spiegel

Hier ergab sich eine relativ große Streuung der Basalwerte (260 - 430 ng/ml, im errechneten Mittelwert 306 ng/ml). Nach LH-RH Applikation steigt die Konzentration von FSH bis t_{30} an (690 ng/ml) und wird zwischen t_{30} und t_{60} sichtlich flacher, wobei es bei zwei Tieren bereits zu einem Abfall des Hormons im Serum kommt. Betrachtet man die Einzelwerte, so liegt der Peak um t_{60} (rd. 720 ng/ml). In der Darstellung der gemittelten Werte zeigt sich hier jedoch eine Abweichung. Hier steigt die Kurve bis t_{120} immer noch leicht an, so daß der Peak erst um t_{120} zu liegen scheint. Die Einzelwertdarstellung jeden Tieres dürfte allerdings aussagekräftiger sein. Der Peak ist somit nach t_{60} (rd. 720 ng/ml) erreicht.

Siehe Abb. 10 und Abb. 11

5.4.3 Flächenverhältnis FSH / LH

Das Flächenverhältnis der Gonadotropine FSH zu LH ergibt einen Faktor von 2,3.

5.4.4 Körpergewicht

Für die Tiere in der Pubertät - mit E8 - ergibt sich ein Durchschnittsgewicht von 89 g.

Siehe Abb. 5 und Tab. II

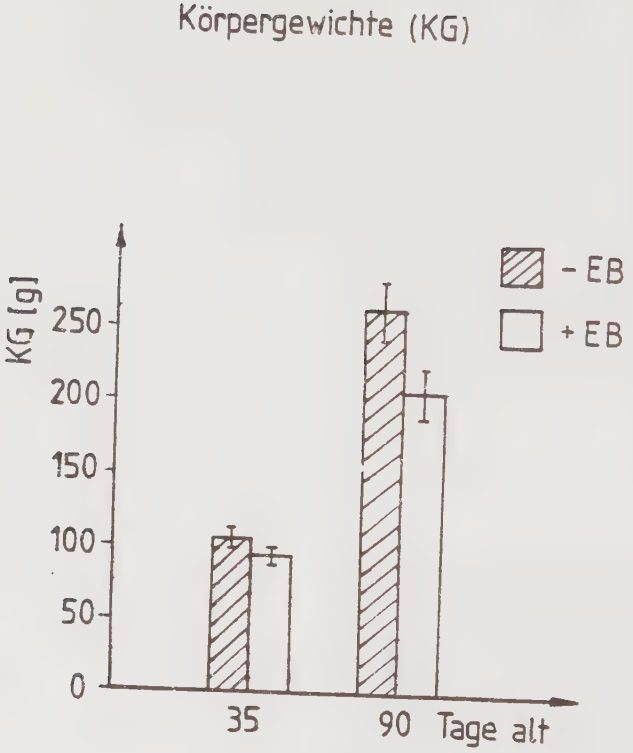

Abb. 5: Körpergewichte (Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichung S -vertikale Linien-) bei neonataler Behandlung mit EB (= □ +EB) und Sesamöl (= ▨ -EB) am 35. und 90. Lebenstag. n = Anzahl der Tiere, 10 je Gruppe.

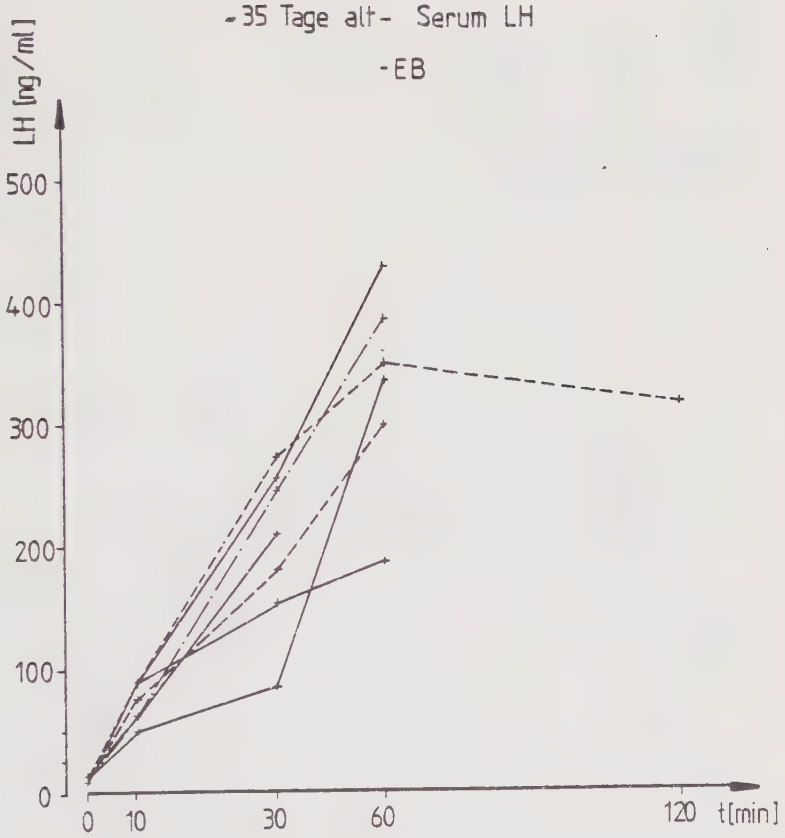

Abb. 6: LH - Konzentration nach LH-RH Applikation bei 35 Tage alten Ratten in Abhängigkeit von der Zeit, die neonatal mit Sesamöl behandelt wurden. Jede Kurve stellt die Hormonausschüttung eines Tieres dar.

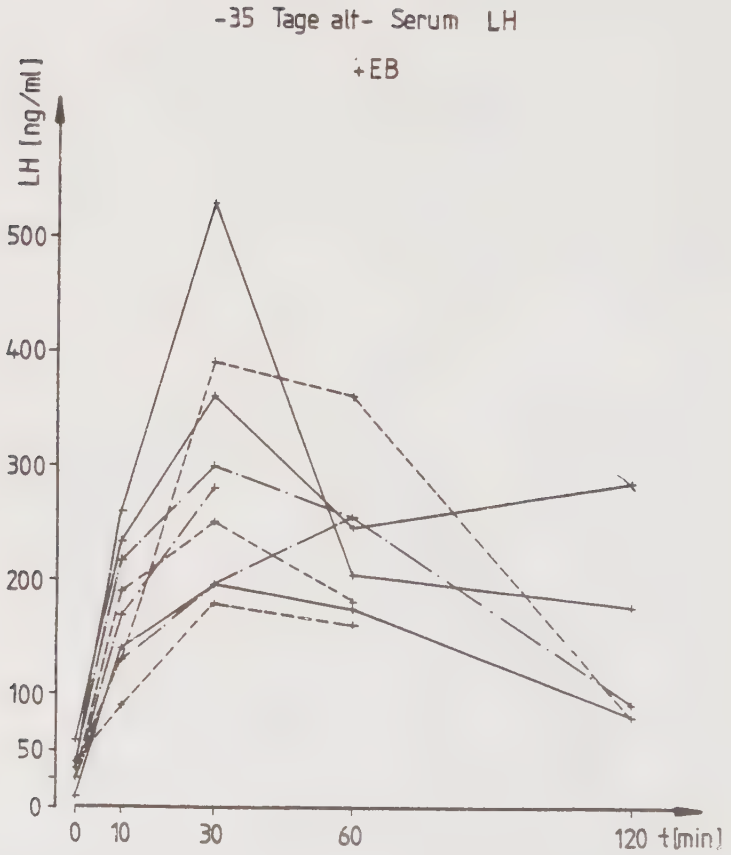

Abb. 7: LH - Konzentration nach LH-RH Applikation bei 35 Tage alten Ratten in Abhängigkeit von der Zeit (t), die neonatal mit EB (+EB) behandelt wurden. Jede Kurve stellt die Hormonausschüttung eines Tieres dar.

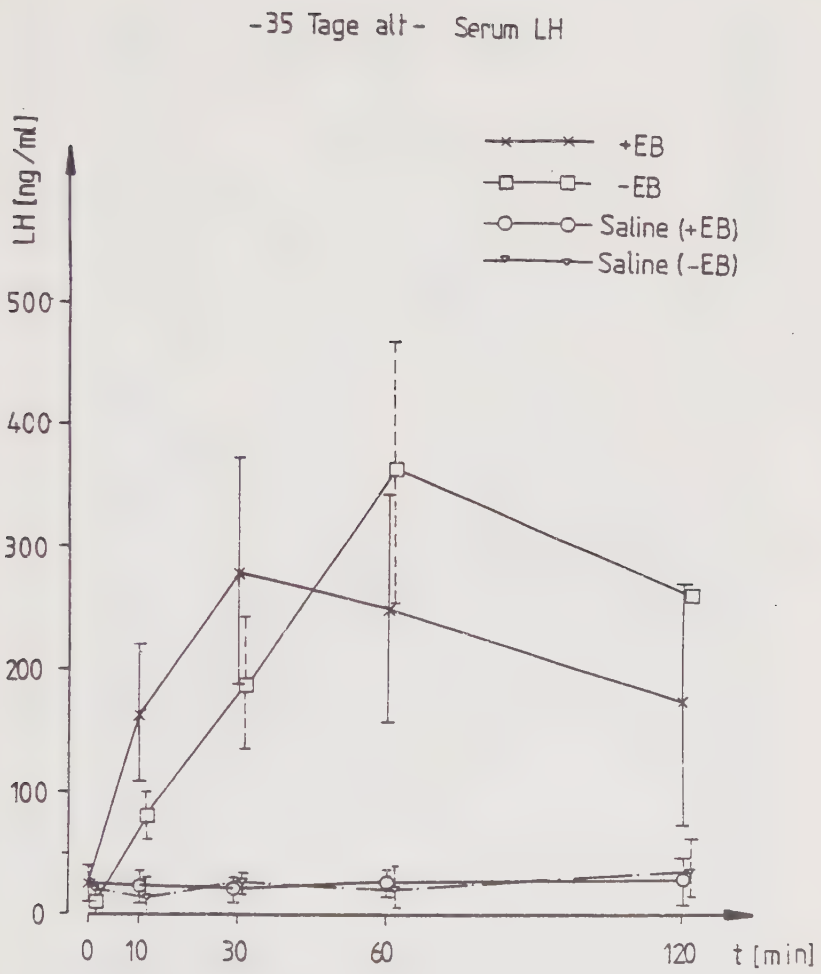

Abb. 8: Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichung S (vertikale Linien) der LH-Konzentration nach LH-RH (—×—×—; —□—□—) bzw. 0,9 %-iger NaCl-Lösung (Saline) (—○—○—; —▽—▽—) Applikation in Abhängigkeit von der Zeit (t) bei 35 Tage alten Ratten, die mit EB (+EB) bzw. Sesamöl (-EB) neonatal behandelt wurden.

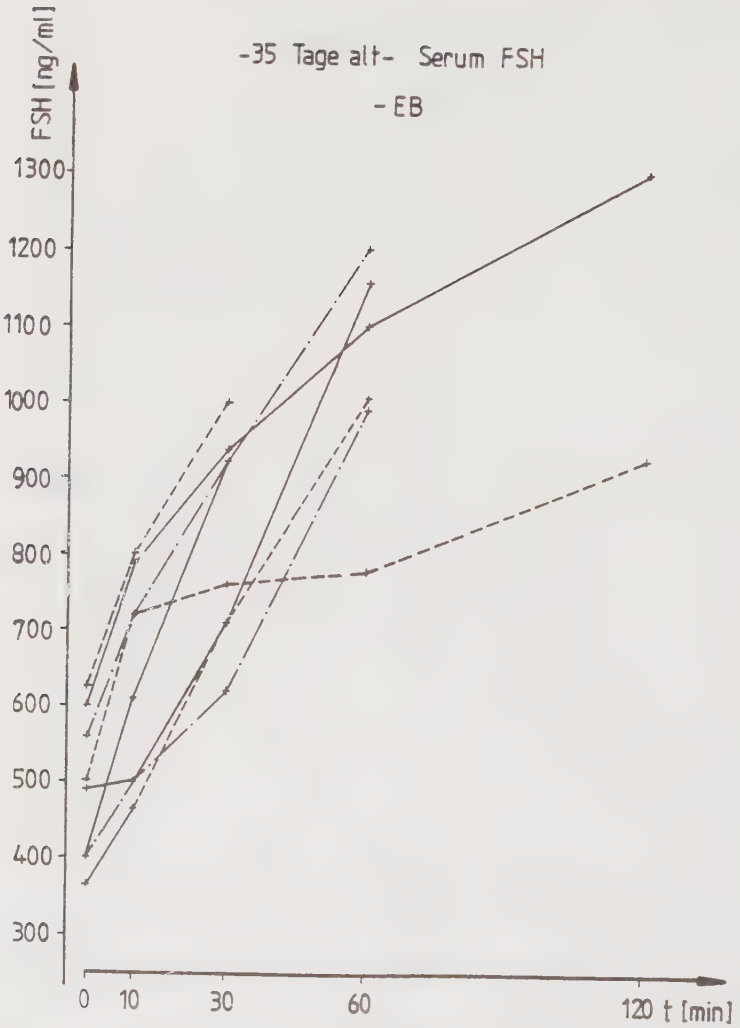

Abb. 9: FSH - Konzentration nach LH-RH Applikation bei 35 Tage alten Ratten in Abhängigkeit von der Zeit (t), die neonatal mit Sesamöl (-EB) behandelt wurden. Jede Kurve stellt die Hormonausschüttung deines Tieres dar.

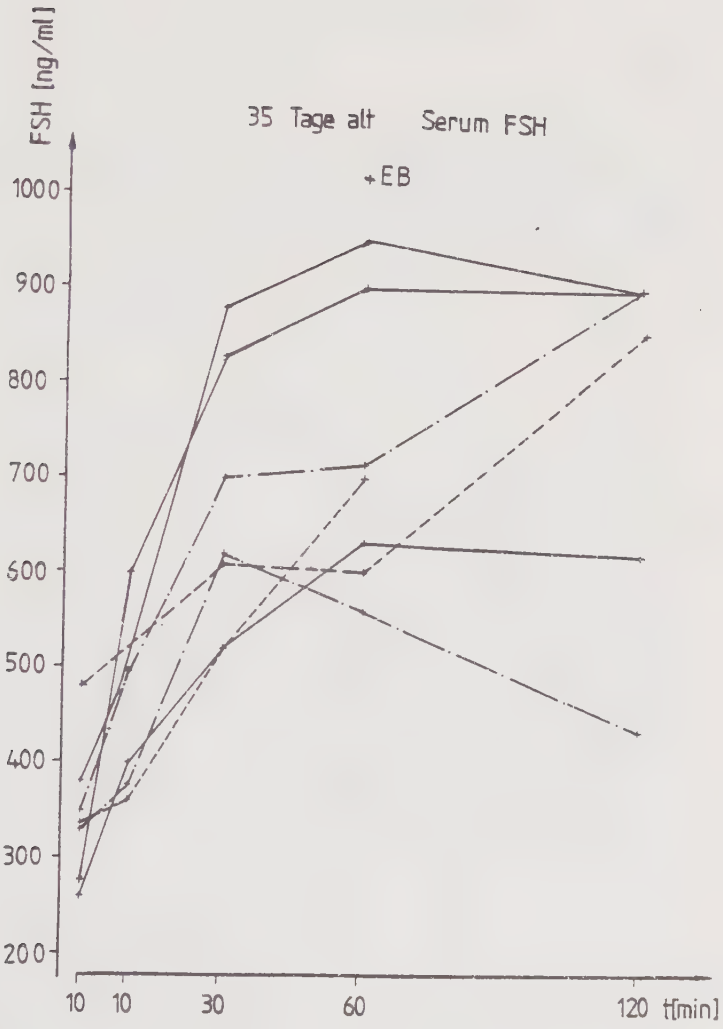

Abb. 10: FSH - Konzentration nach LH-RH Applikation bei 35 Tage alten Ratten in Abhängigkeit von der Zeit (t), die neonatal mit EB (+EB) behandelt wurden. Jede Kurve stellt die Hormonfreisetzung eines Tieres dar.

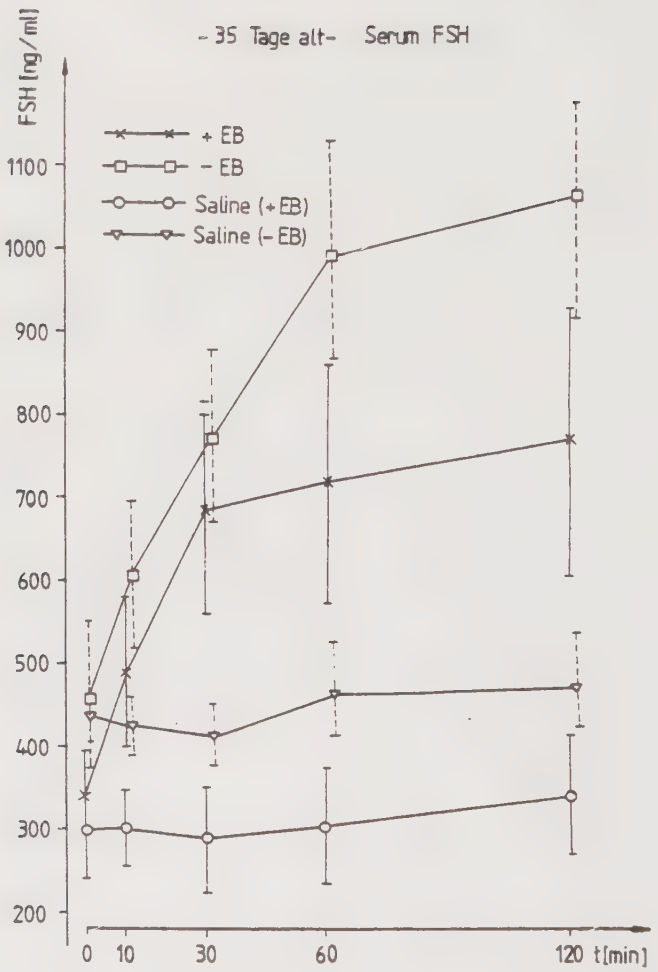

Abb. 11: Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichung S (vertikale Linien) der FSH-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit (t) nach LH-RH (—×—×—; —□—□—) bzw. NaCl 0,9% (Saline) (—○—○—; —▽—▽—) Applikation bei 35 Tage alten Ratten, die neonatal mit EB (+EB) bzw. Sesamöl (-EB) behandelt wurden.

5.5 90 Tage alte Ratten (Adult) ohne EB

5.5.1 LH - Serum - Spiegel

Die Basalwerte liegen im Mittel bei 31 ng/ml. Die Einzelwertdarstellungen der Hormonausschüttung zeigen für alle Tiere einen Anstieg der LH-Serumkonzentration nach LH-RH Injektion bis t_{120} (rd. 510 ng/ml), wo der Peak erreicht ist. Danach fällt die Kurve rasch ab. Bei den gemittelten Werte zeigen sich äquivalente Verläufe.

Siehe Abb. 12 und Abb. 14

5.5.2 FSH - Serum - Spiegel

Ausgehend vom Basalwert (rd. 335 ng/ml) erfolgt für die einzelnen Tiere ein Anstieg des FSH-Serumspiegels bis t_{120} (rd. 890 ng/ml). Von t_o bis t_{30} steiler Anstieg, danach etwas flacherer Verlauf der Kurve. Nach der Zeit t_{120} zeigt der Kurvenverlauf von den einzeln dargestellten 9 Ratten teils noch geringen Anstieg (3 Tiere), teils konstanten Verlauf (2 Tiere) der Hormonausschüttung. Bei den restlichen Tieren fällt die Kurve leicht ab. Der Peak der FSH Ausschüttung liegt zwischen t_{120} und t_{180} Minuten. Die Mittelwertdarstellung zeigt zwischen t_{120} und t_{180} eine Konstante FSH-Serumkonzentrationsfreisetzung.

Siehe Abb. 15 und Abb. 17

5.5.3 Flächenverhältnis FSH / LH

Bei dem Verhältnis der Flächengrößen ergibt sich ein Faktor von 2,6

5.5.4 Körpergewicht

Die adulten Ratten ohne EB wiegen im Durchschnitt 269 g.

Siehe Abb. 5 und Tab II.

5.5 90 Tage alte Ratten (Adult) mit EB

5.5.1 LH - Serum - Spiegel

Die Basalwerte von LH im Serum liegen im Mittel bei 2' ng/ml. Zwischen t_0 und t_{15} kommt es zu einem raschen Anstieg der LH-Serumkonzentrationsausschüttung (rd. 330 ng/ml nach LH-RH Applikation. Die Kurve steigt bis t_{60} weiter an und erreicht hier den Peak (rd. 430 ng/ml). Der Hormonspiegelabfall ist bei den einzelnen Tieren unterschiedlich. Zwei Ratten bleiben relativ konstant in ihrem LH-Serumspiegel bis t_{120}. Bei drei Tieren fällt der Spiegel ab und bei den anderen beiden Tieren kommt es weiterhin zu einem leichten Anstieg. In den gemittelten Werten ist der Peak ebenfalls bei t_{60} erreicht.

Siehe Abb. 13 und Abb. 14

5.5.2 FSH - Serum - Spiegel

Ausgehend vom Basalwert (rd. 325 ng/ml) kommt es bei allen Ratten zu einem Anstieg bis t_{60} (rd. 530 ng/ml). Zwei Tiere zeigen danach wieder einen Abfall des FSH-Serumspiegels. Bei den anderen fünf Tieren steigt die FSH Ausschüttung bis t_{120} weiter an. In der Kurve der gemittelten Werte ergibt sich ebenfalls ein Anstieg bis t_{120}, wo der Peak liegen dürfte, da die Kurve sehr flach verläuft.

Siehe Abb. 16 und Abb. 17

5.5.3 Flächenverhältnis FSH / LH

Bei dem Verhältnis der Flächengrößen ergibt sich ein Faktor von 1,7.

5.5.4 Körpergewicht

Die adulten Ratten - mit EB - liegen im Durchschnitt 2'2 g.

Siehe Abb. 5 und Tab. 11

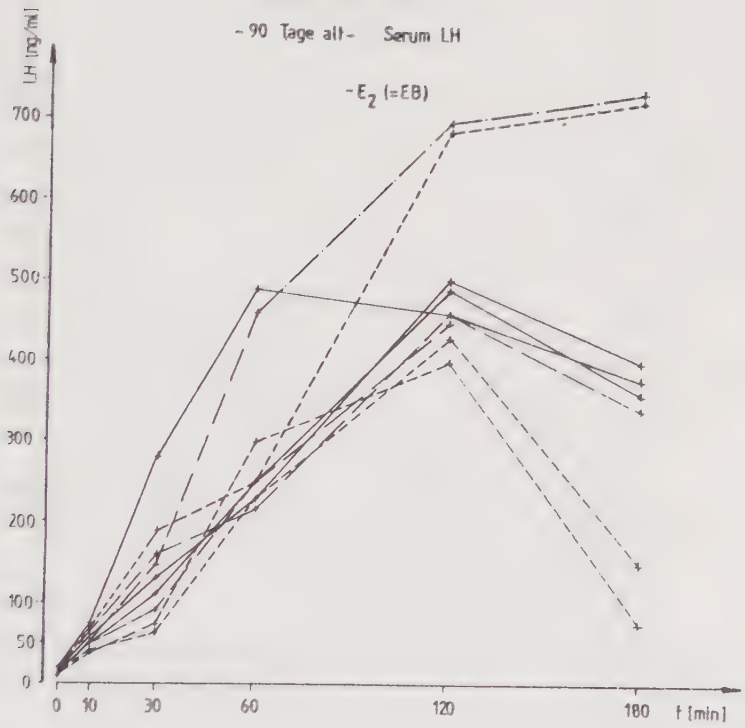

Abb. 12: LH - Konzentration nach LH-RH Applikation bei 90 Tage alten Ratten in Abhängigkeit von der Zeit (t), die neonatal mit Sesamöl (-EB) behandelt wurden. Jede Kurve stellt die Hormonfreisetzung eines Tieres dar.

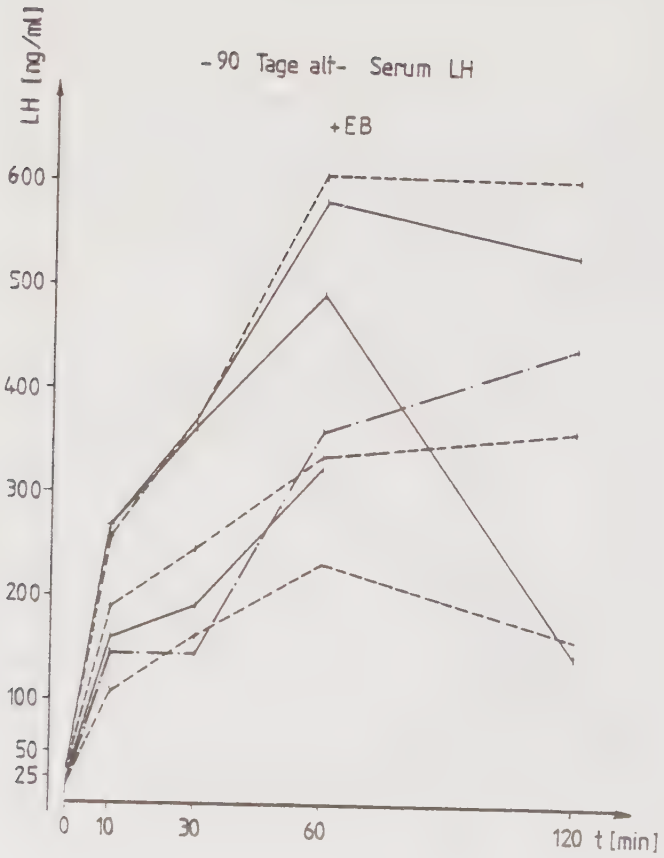

Abb. 13: LH - Konzentration nach LH-RH Applikation bei 90 Tage alten Ratten in Abhängigkeit von der Zeit (t), die neonatal mit EB (+EB) behandelt wurden. Jede Kurve stellt die Hormonfreisetzung eines Tieres dar.

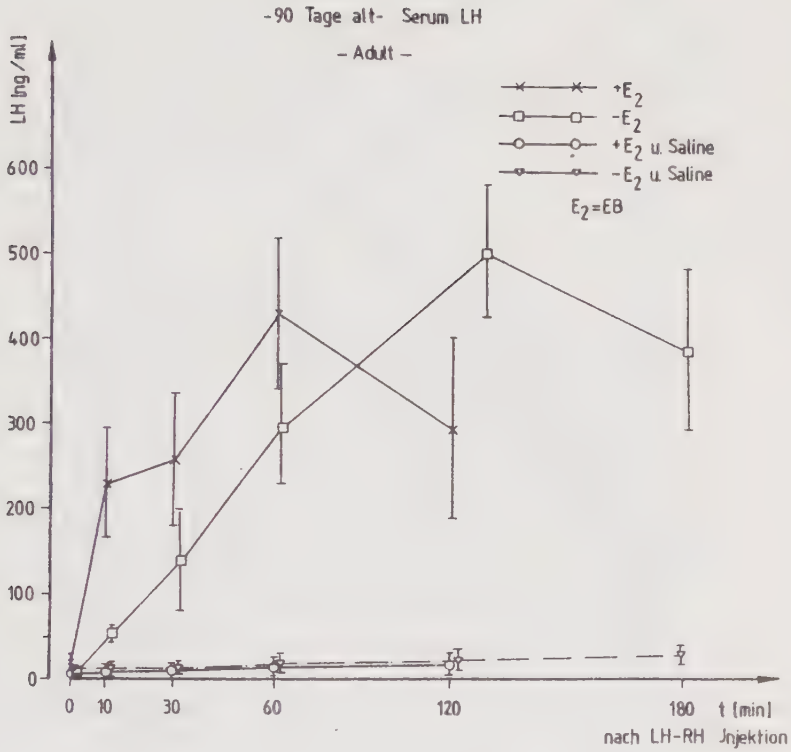

Abb. 14: Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichung S (vertikale Linien) der LH - Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit (t) nach LH-RH (—×—×—; —□—□—) bzw. NaCl 0,9% (Saline) (—○—○—; —▽—▽—) Applikation bei 90 Tage alten Ratten, die neonatal mit EB (+EB) bzw. Sesamöl (-EB) behandelt wurden.

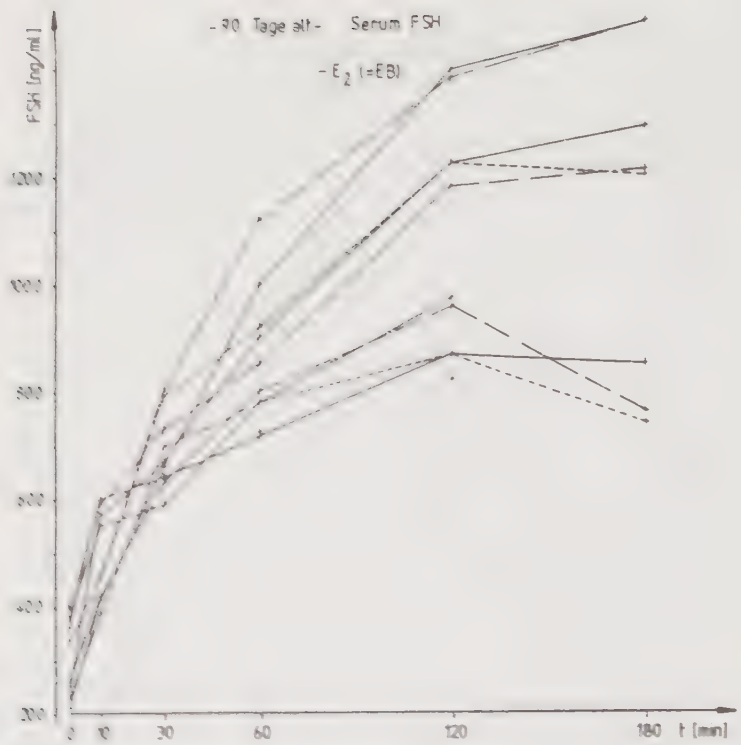

Abb. [illegible] FSH - Konzentration nach LH-RH Applikation in Abhängigkeit von der Zeit (t) bei 90 Tage alten Ratten, die neonatal mit Sesamöl (-EB) behandelt wurden. Jede Kurve stellt die Hormonfreisetzung eines Tieres dar.

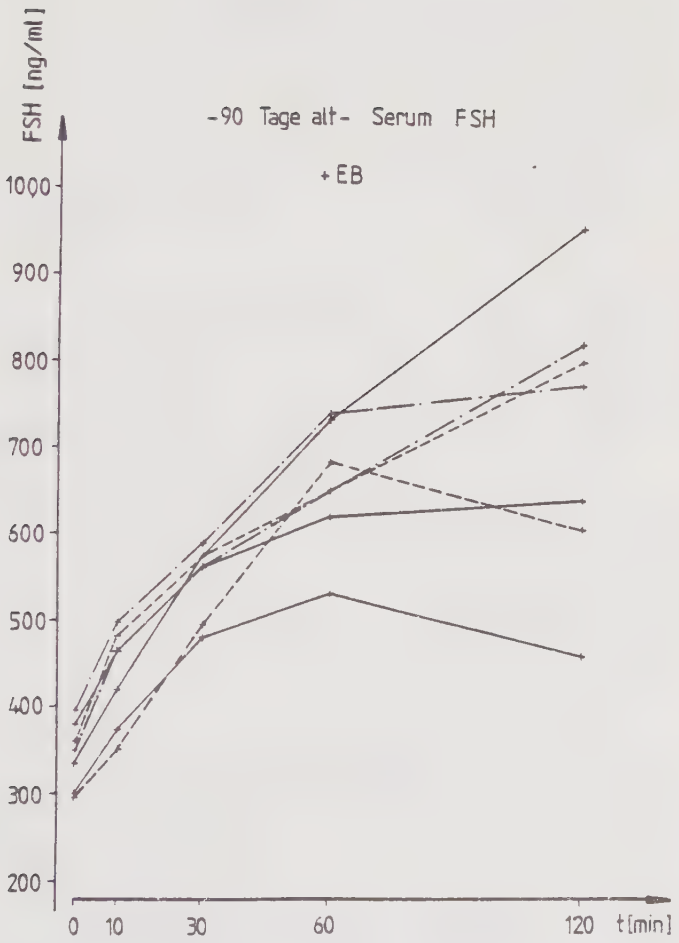

Abb. 16: FSH - Konzentration nach LH-RH Applikation in Abhängigkeit von der Zeit (t) bei 90 Tage alten Ratten, die neonatal mit EB (+EB) behandelt wurden. Jede Kurve stellt die Hormonfreisetzung eines Tieres dar.

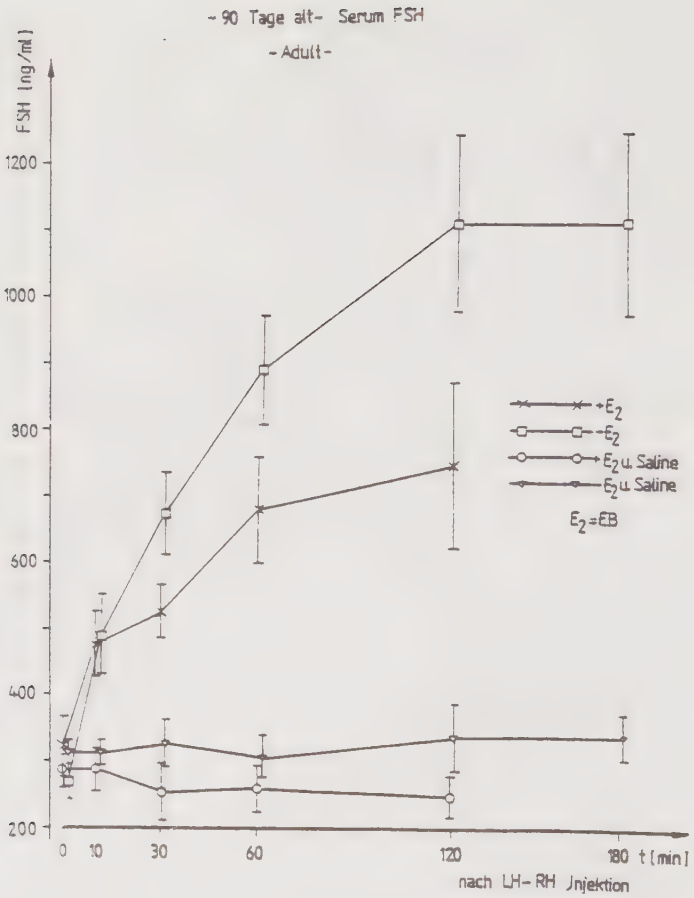

Abb. 17: Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichung S (vertikale Linien) der FSH - Konzentration nach LH-RH (—×—×—; —□—□—) bzw. NaCl 0,9% (Saline) (—○—○—; —▽—▽—) in Abhängigkeit von der Zeit (t), bei 90 Tage alten Ratten, die neonatal mit EB (+EB) bzw. Sesamöl (-EB) behandelt wurden.

6. Diskussion

Die hier gefundenen Basalkonzentrationen der Gonadotropine LH und FSH im Serum bei den mit Sesamöl neonatal behandelten männlichen Ratten (d.h. die Kontrollgruppe, i.f. als unbehandelt bezeichnet) am 35. und 90. Lebenstag sind vergleichbar mit den Werten von früheren Untersuchungen in diesem Labor (GUPTA [33]). Ähnliche Konzentrationen beschrieben auch DÖHLER und WUTTKE [13], NEGRO - VILAR [50], GREELY[29] und MIYACHI[49].

BROWN-GRANT[8] und DEBELJUK[10] fanden bei den unbehandelten Tieren gleiche FSH - Konzentrationen, jedoch niedrigere LH - Basalwerte, die auf oder unterhalb der Grenze der Sensitivität des RIA-s lagen. Höhere Gonadotropinserumwerte für LH im Serum beschrieben OJEDA und RAMIREZ[52].

Vergleichbare Resultate der FSH - Basalserumkonzentrationen bei unbehandelten Ratten ergeben sich also bei allen Forschergruppen. Für die beschriebenen unterschiedlichen LH- Serumkonzentrationen könnte u.a. die kürzere HWZ von LH im Vergleich zu FSH (GUPTA[34], TRÄGER[60]) eine mögliche Ursache sein.

Nach p.n. Behandlung der Ratten am 3.-5. Lebenstag mit je 100 ug pro Tag EB, gesamt 300 ug, kommt es zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Suppression des FSH - Basalserumspiegels am 35. Lebenstag (siehe Tab. I und Abb. 4). Nach 90 Tagen läßt sich kein signifikant ($p > 0,05$) verminderter FSH - Serumspiegel mehr nachweisen. Äquivalente Ergebnisse konnten BROWN - GRANT et al.[7,8] in Ihren Versuchen zeigen.

Die LH - Basalkonzentrationen im Serum nach p.n. Applikation von EB zeigte eine leichte, nicht signifikante ($p > 0,05$) Suppression der LH - Serumwerte nach 35 und 90 Tagen (siehe Tab. I und Abb. 4). Vergleichbare Resultate sind auch hier beschrieben (BROWN - GRANT et al.[7,8]).

GOOMER et al.[24] fanden bei ihren Untersuchungen an weiblichen Ratten, die mit Östradiol 17-ß in der "kritischen Periode" behandelt wurden, einen signifikant niedrigeren Hypophysen- und Plasma LH - Spiegel. Sie folgerten v.a. hieraus, daß das Östradiol einen direkten Einfluß ausübt auf den negativen Feedback zum Hypothalamus in der neonatalen weiblichen Ratte, daß das normale Muster von Plasma und Hypophysen LH in der reifen weiblichen Ratte verändert wird und es wahrscheinlich zu einer chronischen Schwächung der LH-RH Freisetzung aus dem Hypothalamus kommt. Eine Veränderung des basalen Plasma - LH - Spiegels konnte bei männlichen Ratten in diesem Versuch nicht gefunden werden.

Hier konnte gezeigt werden, daß es bei den pubertären männlichen Ratten die p.n. mit EB behandelt wurden, zu einer signifikant ($p < 0,01$) verminderten FSH- Plasmakonzentration bei nicht signifikant ($p > 0,05$) erniedrigter LH-Konzentration kommt. Bei den adulten Tieren ist eine Suppression von FSH im Serum nicht mehr nachweisbar. Da man heute weiß, daß in der Spermiogenese gewisse Reifungsschritte FSH abhängig sind (ATTANASIO [1]), steht dies im Einklang mit den Ergebnissen von LADOSKY und KESIKOWSKI [45], die eine verzögerte Spermatogenese am 35. und 60. Lebenstag beobachteten, die am 90. Tag reversibel war.

Die verminderte FSH - Konzentration deutet darauf hin, daß das EB, perinatal verabreicht, bis zum Erwachsenenalter eine suppressive komponente für FSH sein kann. Diskutiert wird allerdings für FSH auch eine andere negativ rückkoppelnde, nicht identifizierte Substanz, "Inhibin" genannt (siehe Abb. 1), welche wahrscheinlich aus den Tubuli seminiferi freigesetzt wird (GUPTA[34], LABRIE[46]). Allerdings wurde eine reduzierte Zahl der Tubuli seminiferi bei p.n. Östradiolbenzoat-(EB) Behandlung beschrieben (LADOSKY und KESIKOWSKI[45]), was dann einen positiven Feedback voraussetzen würde.

Vergleicht man diese Suppression von FSH im Serum ohne Abnahme der Plasma - LH - Konzentration zusammen mit der Ergebnissen von BARTKE [5], BROWN-GRANT [8], DANUTRA [9] und TCHOLAKIAN[61], die eine Abnahme der peripheren Testosteronspiegel ohne Abnahme der Plasma - LH - Konzentration nach postnataler EB Behandlung fanden, so liefert diese Untersuchung zusätzliche Unterstützung der von ODELL[51] beschriebenen Vorstellung, daß die FSH-Empfindlichkeit des Hodens neben der steroidogenen Wirkung von LH ein wichtiger Faktor für die sexuelle Reifung der männlichen Ratte ist.

Die Untersuchung zeigt nun, wie sich die Gonadotropinfreisetzung in Abhängigkeit von der Zeit (t) nach LH-RH bzw. NaCl 0,9% (Saline) Applikation bei in der "kritischen Periode" p.p. mit EB behandelten im Vergleich zu unbehandelten (Sesamöl) männlichen Ratten nach 35 bzw. 90 Tagen verhält.

Nach der Injektion von NaCl 0,9% (Saline) bei behandelten und unbehandelten Tieren kommt es zu keinem Anstieg der Gonadotropine LH und FSH im Serum.

Siehe Abb. 8, 11, 14 und 17

Ausgehend von signifikant ($p < 0,01$) unterschiedlichen Basalwerten (t_0) für FSH der pubertären Ratten, ergibt sich für beide Gruppen A_1 und B_1 eine vergleichbar schnelle Freisetzung des Hormons (Anstieg der Kurven) bis t_{30} (siehe Abb. 11). Danach kommt es bei der Gruppe A_1 (behandelt) zu einer Abschwächung der FSH-Ausschüttung. Der Peak, d.h. das Maximum der FSH Abgabe ist bei den mit EB behandelten Tieren zeitlich früher erreicht. Vergleicht man die Flächen unter den Kurven, so zeigt sich eine Suppression der Hormonfreisetzung bei der Gruppe A_1. Die Ausschüttung nach t_{60} und t_{120} (Min.) ist signifikant ($p < 0,01$) erniedrigt.

Bei den adulten Ratten kam es ohne signifikant ($p > 0,05$) unterschiedlicher Basalkonzentration zu vergleichbar

schneller FSH Ausschüttung in beiden Gruppen A_2 und B_2 bis t_{10} (Abb. 17). In der Gruppe A_2 (behandelt) kommt es dann zu einer Hemmung der Hormonfreisetzung. Das Maximum der FSH Ausschüttung ist auch hier signifikant ($p<0,01$) erniedrigt und der Peak ebenfalls wie bei den pubertären Tieren früher erreicht.

Die Behandlung der Ratten p.p. mit tB führt also zu einer Suppression der FSH Freisetzung aus der Hypophyse nach LH-RH Stimulation bei den pubertären und adulten Ratten mit gleichzeitig schnellerem Erreichen der Peaks. Dies läßt vermuten, daß der Gonadostat durch die neonatale EB Behandlung verändert wird. Unklar ist bis heute, wie der Hoden die FSH Produktion beeinflußt. Diese Untersuchung deutet darauf hin, daß es durch die neonatale EB Behandlung zu einer chronischen Beeinträchtigung der Hypophyse über den Feedback - beinflußt durch Hormonproduktion des Hodens - für die Freisetzung von FSH nach LH-RH Stimulation kommt (siehe Abb. 1). Ebenso könnte auch die oben beschriebene Substanz "Inhibin" eine Rolle spielen.

Bei der hypophysären Antwort von LH nach LH-RH Applikation ergibt sich eine raschere Hormonfreisetzung bei den behandelten (Gruppe A_1 und A_2) im Vergleich zu den unbehandelten (Gruppe B_1 und B_2) pubertären und adulten Tieren (Abb. 8 und 14). Bereits nach 10 Minuten ist die LH Freisetzung signifikant ($p<0,01$) erhöht. Obgleich der Peak in den behandelten Ratten früher erreicht ist, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede bei den Maximalkonzentrationen. Die Hypophyse reagiert also schneller mit der Freisetzung von LH nach LH-RH, ohne daß die Gesamtmenge (repräsentiert durch die Flächen unter den Kurven von Abb. 8 und 14) der Hormonkonzentration signifikant differieren. So kommt es also auch hier zu einer Veränderung der hypophysären LH Ausschüttung, jedoch nicht zu einer Suppression wie bei FSH, was eine Sensitivitätsänderung des Regelkreises vermuten läßt.

DEBELJUK [11], konnte bei einer Behandlung mit 50 ug Östradiol (nicht dagegen mit 20 ug EB) an erwachsenen Ratten zeigen, daß es zu einer signifikanten Hemmung der FSH Freisetzung und zu einer vermehrten LH Freisetzung nach LH-RH Stimulation kommt. Allerdings beruhen seine Aussagen auf einen definierten Zeitpunkt nach 20 Minuten. Vergleicht man sein Ergebnis mit dieser Untersuchung ebenfalls beschränkt auf den Zeitpunkt t_{20}, so ergeben sich vergleichbare Resultate. Aus den Kurven der Abbildungen 8 und 14 ist jedoch ersichtlich, daß das LH nur rascher freigesetzt wird, die Gesamthormonmenge aber nahezu konstant bleibt.

Dies deutet darauf hin, daß die Gonadotropinfreisetzung nach LH-RH bei neonataler EB Behandlung vergleichbar ist mit einer EB Behandlung im Erwachsenenalter. Allerdings führt die neonatale EB Injektion zu einer permanenten Veränderung der LH und FSH Ausschüttung nach LH-RH Stimulation. Die EB Gabe bei erwachsenen Ratten dagegen, so konnte VAN DIETEN [62] 1974 zeigen, führt nur zu einer vorübergehenden Veränderung der Gonadotropinfreisetzung nach LH-RH.

Bei der Bestimmung der Körpergewichte (KG) kommt es bei den Gruppen A_1 und A_2 verglichen mit den Gruppen B_1 und B_2 zu einer signifikanten Gewichtsreduktion am 35. Lebenstag ($p < 0,01$) und am 90. Lebenstag ($p < 0,001$). Dies steht im Widerspruch zu anderen Untersuchungen (42, 44 und 45). BROWN-GRANT [8] beschreibt eine Gewichtsreduktion von durchschnittlich 50 g nach 85 Tagen. Möglich für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte die hier relativ hohe Östradiolkonzentration verabreicht auf drei aufeinanderfolgenden Tagen sein. GUPTA [32] fand bei neonataler Gabe von Testosteron-Antiserum (TA) bei männlichen Ratten nach 90 - 95 Tagen eine signifikante Gewichtsreduktion. Die neonatale Gabe von Gonadotropin-Antiserum hatte keinen Einfluß auf das Körpergewicht.
(Siehe Tab. II)

Quotient FSH zu LH

Aus dem Verhältnis FSH zu LH der jeweils altersentsprechenden Gruppen läßt sich erkennen, daß die Stimulierbarkeit der beiden Gonadotropine durch EB in der "kritischen Periode" p.n. verabreicht, nicht einheitlich verändert wird. EB bewirkt eine Hemmung der Gesamtausschüttung von FSH. LH dagegen wird schneller freigesetzt bei den behandelten Ratten, jedoch bleibt die Gesamthormonmenge über die Zeit von 120 Minuten nahezu konstant (siehe S.46 und Abb. 8 und 14). Somit läßt sich aus dem Quotienten FSH / LH bei nahezu konstanter LH Freisetzung in behandelten und unbehandelten Tieren die prozentuale Suppression von FSH errechnen. Bei den neonatal behandelten Ratten mit 300 ug EB kommt es nach 35 Tagen zu einer 27 %-igen, nach 90 Tagen zu einer 35 %-igen Reduzierung von FSH nach LH-RH Injektion. FSH wird also ca. zu einem Viertel bzw. einem Drittel durch die neonatale EB Behandlung in seiner Ausschüttung nach LH-RH gehemmt. Somit wird deutet sich an, daß das FSH wie oben beschrieben, der entscheidendere Faktor für die sexuelle Differenzierung ist.

7. Zusammenfssung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluß, den 300 ug Östradiolbenzoat (EB) neonatal s.c. appliziert auf die Gonadotropine LH und FSH nach 35 - (pubertär) bzw. 90 - Lebenstagen (adult) ausübt. Verglichen wurden diese Tiere mit einer Kontrollgruppe, denen Sesamöl zum gleichen Zeitpunkt injiziert wurde.

Die Basalkonzentration im Serum von FSH bei den mit EB behandelten Ratten war am 35. Lebenstag signifikant erniedrigt, nicht dagegen am 90. Lebenstag. Bei den LH-Basalwerten ergaben sich bei den pubertären und adulten Ratten keine Veränderungen im Vergleich zu den mit Sesamöl behandelten Tieren.

Zu einer signifikanten Suppression nach LH-RH Injektion kam es bei den mit EB behandelten Ratten für das Hormon FSH im Serum in beiden Altersgruppen, und der Peak wurde früher erreicht. EB führte dagegen nicht zu einer Suppression der LH-Ausschüttung nach LH-RH, jedoch kam es zu einer schnelleren Freisetzung und zu einem ebenfalls schnellerem Erreichen des Peaks, ohne daß die Gesamtkonzentration verändert war. Auch aus dem Quotienten FSH / LH läßt sich ablesen, daß das EB neonatal appliziert zur alleinigen Suppression von FSH, nicht dagegen von LH nach LH-RH Injektion führt.

Das Körpergewicht der pubertären und adulten Ratten wurde durch die neonatale Behandlung mit Östradiolbenzoat (EB) erniedrigt.

8. Anhang

Abkürzungen, Trivialnamen und systematische Bezeichnungen der untersuchten Steroide:

C-21	Kohlenstoffatom 21 (Steroid)
EB	Östradiolbenzoat
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
Gn-RH	Gonadotropin - releasing hormone Gonadotropin - Freisetzungsfaktor
HWZ	Halbwertszeit
HVL	Hypophysenvorderlappen
LH	luteinizing hormone luteinisierendes Hormon
17-Oxyre.	Reduktion am Kohlenstoffatom 17
n.n.	neonatal
p.n.	perinatal
p.p.	post partum
RIA	Radioimmunassay
Saline	Physiologische Kochsalzlösung, NaCL 0,9%
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1) ATTANASIO, A., in:
Hormone im Kindesalter
Eds.: GUPTA, D.

Schattauer Verlag, Stuttgart - New York
S. 140 ff (1980)

2) BARRACLOUGH, C.A.:
Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate

Endocrinology 68: 62 - 67 (1961)

3) BARRACLOUGH, C.A. and GORSKI, R.A.:
Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat

Endocrinology 68: 68 -79 (1961)

4) BARRACLOUGH, C.A. and GORSKI, R.A.:
Studies on mating behaviour in th androgen-sterilized female rat in relation to the hypothalamic regulation of sexual behaviour

J. Endocrinology 25: 175 - 182 (1962)

5) BARTKE, A., WILLIAMS, K.I.H. and DALTERIO, S.:
Effects of estrogens on testicular testosterone production in vitro

Biol. of Reproduction 17: 645 - 649 (1977)

6) BERTHOLD, A.A.:
Transplantation der Hoden

Arch. Anat. Physiol. 42 - 46 (1849)

7) BROWN-GRANT, K.:
On "critical periods" during the post-natal development of the rat
in:
Endocrinologie sexuelle de la pèriode pèrinatale
Eds.: FOREST, MG., BERTRAND, J.

Paris, S. 357 - 375 (1974)

8) BROWN-GRANT, K., FINK, G., FENELLA GREIG and MURRAY, M.:
Altered sexual development in male rats after oestrogen administration during the neonatal period

J. Reprod. Fert. 44: 25 - 42 (1975)

8a) CLAUSS, G. und EBNER, H., in:
Grundlagen der Statistik
Für Psychologen, Pädagogen und Soziologen

Verlag Harri Deutsch, Zürich und Frankfurt a.M. (1975)

9) DANUTRA VARAPAN, HARPER, M.E., BOYNS, A.R., COLE, E.N., BROWNSEY, B.G. and GRIFFITHS, K.:
The effect of certain stilboestrol analogues on plasma prolactin and testosterone in the rat
J. Endocrinology 57: 207 - 215 (1973)

10) DEBELJUK, L., ARIMURA, A. and SCHALLY, A.V.:
Effects of testosterone and estradiol on the LH and FSH release induced by LH-Releasing Hormone (LH-RH) in intact male rats
Endocrinology 90: 1578 - 1581 (1972)

11) DEBELJUK, L., VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., ARIMURA, A. and SCHALLY, A.V.:
Effect of gonadal steroids on the response to LH-RH in intact and castrated male rats
Endocrinology 94: 1519 - 1524 (1974)

12) DHAR, J.D. and SETTY, B.S.:
Epididymal response to exogenous testosterone in rats sterilized neonatally by estrogens
Endokrinologie 68: Heft 1, 14 - 21 (1976)

13) DÖHLER, K.D. and WUTTKE, W.:
Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats
Endocrinology 97: 898 - 907 (1975)

14) DÖRNER, G.:
Zur Bedeutung prä- oder perinataler Umweltsbedingungen für die postnatale Regelung neuroendokriner Systeme
Endokrinologie 61: Heft 1, 107 - 124 (1973)

15) DÖRNER, G. and DÖCKE, F.:
A sex specific reaction of the hypothalamo-hypophyseal system of rats
J. Endocrinology 30: 265 (1964)

16) DÖRNER, G., DÖCKE, F. and HINZ, G.:
Paradoxial effects of estrogens on brain differentiation
Neuroendocrinology 7: 146 - 155 (1971)

17) DONOVAN, B.T.:
The extrahypothalamic control of gonadotrophin secretion
in: Control of gonadal steroid secretion
BAIRD, D.T. and STRONG, J.A.
Edinburgh Univ. Press. Edinburgh, pp. 2 - 14 (1971)

18) DONOVAN, B.R., VAN DER WERFF TEN BOSCH, J.J.:
The hypothalamus and sexual maturation in the rat

J. Physiol. 147: 78 (1959)

19) EVERETT, J.W.:
Brain, pituitary gland, and the ovarian cycle

Biol. Reprod. 6 3 - 12 (1972)

20) FELS, E.:
Keimdrüsenfunktion der Ratte nach pränataler Injektion von Oestradiol Benzoat

Endokrinologie 62: Heft 1, 10 - 16 (1973)

21) FELS, E. and BOSCH, L.R.:
Effect of prenatal administration of testosterone on ovarian function in rats

Amer. J. obstet. Gynec. 111: 964 (1971)

22) FELS, E. und LAMATTINA, J.C.:
Die Wirkung von postnatal injiziertem Östradiol oder Progesteron auf die Hodenfunktion der Ratte

Endokrinologie 61: Heft 1, 25 - 31 (1973)

23) FLERKO, B., PETRUSZ, B. and TIMA, L.:
On the mechanism of sexual differentiation of the hypothalamus

Acta biol. hung 18: 27 - 36 (1967)

24) GOOMER, N., SAXENA, R.N. and SHETH, A.R.:
Effect of neonatal testosterone and oestradiol treatment on the development of the hypothalamo - hypophysial axis in the female rat

J. Reprod. Fert. 50: 239 - 243 (1977)

25) GORSKI, R.A.:
Modification of ovulatory mechanismsby postnatal administration of estrogen to the rat

Amer. J. Physiol. 205: 842 (1963)

26) GORSKI, R.A.:
Steroid hormons and brain function: Progress, principles and problems
in:
Steriod Hormones and Brain Function
SAWYER, C.A. and GORSKI, R.A.

Univ. of California Press, Los Angeles, pp. 1 - 26 (1971)

27) GORSKI, R.A.:
Perinatal effects of sex steroids on brain development and function

Prog. in Brain Research 39: 149 - 163 (1973)

28) GORSKI, R.A. and WAGNER, F.:
Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus

Endocrinology 76: 226 - 239 (1965)

29) GREELY, G.H., VOLCAN, I.J. and MAHESH, V.B.:
Direct effects of estradiol benzoat and testosterone on the response of the male rat pituitary to luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH)

Biology of Reprod. 18: 256 - 263 (1978)

30) GUPTA, D., in:
Hypothalamic Hormones - Structure, Synthesis and Biological Activity
Eds.: D. GUPTA and W. VOELTER

Verlag Chemie, Weinheim (1975)

31) GUPTA, D., in:
Hypothalamic Hormones - Chemistry, Physiology and Clinical Applications
Eds.: D. GUPTA and VOELTER, W.

Verlag Chemie, Weinheim (1978)

32) GUPTA, D.:
Effects of sex hormone antisera on sexual differentiation of the brain
in: Hormones and Brain Development
Eds.: G. DÖRNER and M. KAWAKAMI

Elsevier / North-Holland Biomedical Press (1978)

33) GUPTA, D. and EICHNER, M.:
Interactions of gonadal steroids, gonadotropins and gonadotropin-releasing hormons in sexual maturation

Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 11
579 - 586 (1979)

34) GUPTA, D., RAGER, K., ZARZYCKI, J. and EICHNER, M.:
Levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and dihydrotestosterone in the circulation of sexually maturing intact male rats and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism

J. Endocrinology 66: 183 - 193 (1975)

35) GUPTA, D., ROHR, M. und EICHNER, M., in:
Hormone im Kindesalter
Eds.: GUPTA, D.

Schattauer Verlag, Stuugart - New York, S. 1ff (1980)

36) HAGEMANN, E. und SCHMIDT, G.:
Ratte und Maus als Versuchstier in der Forschung

Gruyter - Verlag, Berlin (1960)

37) HARRIS, G.W.:
Neural Control of the Pituitary Gland

Arnold, London (1955)

38) HARRIS, G.W.:
Sex hormones, brain development and brain function

Endocrinology 75: 627 - 648 (1964)

39) HARRIS, G.W. and LEVINE, S.:
Sexual differentiation of the brain and its experimental control

J. Physiology London 181: 379 (1965)

40) HOHLWEG, W. und JUNKMANN, K.:
Die hormonal-nervöes Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens

Klin. Wochenzeitschrift 11: 321 (1932)

41) IGARASHI, M. and McCANN, S.M.:
A hypothalamic follicle stimulating hormone-releasing factor

Endocrinology 74: 446 - 452 (1964)

42) JOSEPH, A.A. and KINCL, F.A.:
Neonatal sterilization of rodents with steroid hormones:
5. A note on the influence of neonatal treatment with estradiol benzoat or testosterone propionate on steroid metabolism in the brain an testes of adult male rats

J. of Steroid Biochemistry, Vol 5, 227 - 231 (1974)

43) KINCL, F.A., FOLCH PI, A. and HERRERA LASSO, L.:
Effect of estradiol benzoate treatment in the newborn male rat

Endocrinology 72: 966 - 968 (1963)

44) KINCL, F.A. and ZBUZKOVA, V.:
Neonatal sterilization of rodents with steroid hormones
3. Influence of neonatal treatment with testosterone propionate or estradiol benzoate on steroids in plasma of adult male rats

J. of Steroid Biochemistry, Vol 2, 215 - 221 (1971)

45) LADOSKY, W. and KESIKOWSKI, W.M.:
Testicular development in rats treated with several steroids shortly after birth

J. Reprod. Fert. 19: 247 - 254 (1969)

46) LABRIE, F., LAGACE`, L., FERLAND, L., KELLY, P.A., DROUIN, J., MASSICOTTE, J., BONNE, C., RAYNAUD, J.P. and DORRINGTON, J.H.:
Interactions between LH-RH, sex steroids and "Inhibin" in the control of LH and FSH secretion

International Journal of Andrology, Supplement 2: 81 - 101 (1978)

47) MARTINI, L., FRASCHINI, F. and MOTTA, M.:
Neural control of anterior pituitary functions

Recent Prog. Hormon Res. 24: 439 -496 (1968)

48) McDONALD, P.G. and DOUGHTY, C.:
Effect of neonatal administration of different androgens in the female rat:
Correlation between aromatization and the induction of sterilization

J. Endocrinology 61: 95 - 103 (1974)

49) MIYACHI, Y., NIESCHLAG, E. and LIPSETT, M.B.:
The secretion of gonadotropins and testosterone by the neonatal male rat

Endocrinology 92: 1 - 5 (1973)

50) NEGRO-VILAR, A., KRULICH, L. and McCANN, S.M.:
Change in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat

Endocrinology 93: 660 - 664 (1973)

51) ODELL, W.D., SWERDLOFF, R.S., JACOBS, H.S. and HESCOX, M.A.:
FSH induction of sensitivity to LH:
One cause of sexual maturation in the male rat

Endocrinology 92: 160 - 165 (1973)

52) OJEDA, S.R. and RAMIREZ, V.D.:
Plasma level of LH and FSH in maturing rats:
Response to hemigonadectomy

Endocrinology 90: 466 - 472 (1972)

53) OJEDA, S.R., WHEATON, J.E., JAMESON, H.E. and Mc CANN, S.M.:
The onset of puberty in the female rat:
Changes in plasma prolactin, gonadotropins, luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) and hypothalamic LH-RH content

Endocrinology 98: 630 (1976

54) PFEIFFER, C.A.:
Sexual differences of the hypophyses and their determination by the gonads

Amer. J. Anat. 58: 195 - 226 (1936)

55) SCHALLY, A.V., BOWERS, C.Y., WHITE, W.F. and COHEN,A.I.:
Purification and in vivo and vitro studies with porcine luteinizing hormones - releasing factor

Endocrinology 81: 77 (1967)

56) SCHALLY, A.V., SAITO, R., ARIMURA, A., SAWANO, S., BOWERS, C.Y., WHITE, W.F. and COHEN, A.I.:
Purification and in vitro and in vivo studies with porcine hypothalamic follicle - stimulating hormone - releasing factor

Endocrinology 81: 882 (1967)

57) SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., BOWERS, C.Y., KASTIN, A.J., SAWANO, S. and REDDING, R.W.:
Hypothalamic neurohormones regulation anterior pituitary function

Recent Prog. Hormone Res. 24: 497 (1968)

58) SCHALLY, A.V. ARIMURA, A., BOWERS, C.Y., WAKABAYSHI, I., KASTIN, A.J., REDDING, T.W., MITTLER, J.C., NAIR, R.M.G., PIZZOLATO, P. and SEGAL, A.J.:
Purification of hypothalamic releasing hormones of human origin

J. Clin. Endocrinology 31: 291 (1970)

59) SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., BABA, Y., NAIR, R.M.G., MATUSO, H., REDDING, T.W., DEBELJUK, L. and WHITE,W.F.:
Isolation and properties of the FSH and LH - Releasing Hormone

Biochem. Biophys. Res. Commun 43: 393 - 399 (1971)

60) TRÄGER, L.:
Steroidhormone
Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung

SpringerVerlag, Berlin-Heidelberg-New York S. 83 ff (1977)

61) TCHOLAKIAN, R.K. and CHOWDHURY, M. and STEINBERGER, E.:
Time of action of estradiol - 17β on luteinizing hormone and testosterone

J. Endocrinology 63: 411 - 412 (1974)

62) VAN DIETEN, J.A.M.J., STEIJSIGER, J., DULLAART, J. and VAN REES, G.P.:
The effect of estradiol benzoate on the pituitary responsiveness to LH-RH in male and female rats

Neuroendocrinology 15: 182 - 188 (1974)

D a n k s a g u n g

Herrn Prof. Dr. D. Gupta danke ich besonders für die Überlassung des Themas sowie für die freundliche Untersützung während meiner Tätigkeit in seinem Labor.

LEBENSLAUF

Am 29. Januar 1950 wurde ich, Karl-Heinz Fischer, als Sohn des Albin Fischer und seiner Ehefrau Friederike, geb. Heimüller in Gräfendorf geboren.

Von 1956 bis 1962 besuchte ich die Grundschule in Gräfendorf - Kreis Main-Spessart - und von 1962 bis 1966 die Realschule in Gemünden a.M. Nach einem Praktikum und anschließendem Maschinenbaustudium an der Fachhochschule in Schweinfurt erlangte ich 1972 den Ingenieur grad.

Von 1972 bis 1973 studierte ich an der Universität in München die Fachrichtungen Lehramt für berufsbildende Schulen, Mathematik und Sport.

Im WS 1973 begann ich mein Medizinstudium an der Universität in Würzburg und wechselte nach vier Semestern an die Universität Tübingen. Im März 1976 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, im März 1977 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und im März 1980 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Das Praktische Jahr absolvierte ich am Kreiskrankenhaus (Lehrkrankenhaus) in Reutlingen und in der Hautklinik der Universität Tübingen. Am 24. April 1981 bestand ich den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45